



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

Corso di Dottorato di Ricerca in Alimenti e Salute Umana
Ciclo XXXI

Tesi di Dottorato di Ricerca

EFFETTI DELL'INIBIZIONE DELLA RNA BINDING PROTEIN HuR NEL TUMORE TIROIDEO

Dottorando:

Dott. Allegri Lorenzo

Tutor:

Prof. Giuseppe Damante

Coordinatore:

Prof. Walter Baratta

Anno Accademico 2017-2018

Sommario

SINOSSI.....	4
INTRODUZIONE	6
RNA binding proteins	6
L'RNA BINDING PROTEIN HUR	18
HuR nelle neoplasie	27
L'inibizione di HuR	28
I TUMORI TIROIDEI.....	30
Il carcinoma anaplastico della tiroide (ATC)	33
HuR IN TIROIDE	41
SCOPO DELLA TESI	43
MATERIALI E METODI	44
Colture cellulari.....	44
Preparazione di estratti proteici	44
Western Blot	45
Trasfezione cellulare e silenziamento.....	47
MTT-assay	48
Soft Agar-assay	48
Retrotrascrizione	49
Real Time PCR	50
Scratch-assay	51

RBP Immunoprecipitation (RIP)	51
Overespressione di MAD2	52
Analisi Statistiche	53
RISULTATI	54
Espressione di HuR in ATC	54
Effetti del silenziamento di HuR in linee cellulari di tumore anaplastico tiroideo	55
Il silenziamento di HuR	55
Effetti del silenziamento di HuR su vitalità cellulare ed apoptosi	56
Effetti del silenziamento di HuR sull'aggressività tumorale	58
Effetti dell'acido idrossissamico SAHA sull'espressione di HuR.....	59
Effetti del SAHA sull'espressione di HuR in cellule di tumore anaplastico tiroideo	59
Effetti del SAHA su NF- κ B in cellule di tumore anaplastico tiroideo	61
Effetti dell'inibizione di HuR in linee cellulari di tumore tiroideo	62
Effetti di CMLD-2 sulla vitalità cellulare in linee cellulari di tumore tiroideo.....	62
Effetti di CMLD-2 sull'apoptosi in cellule di tumore tiroideo	64
Effetti di CMLD-2 sull'aggressività tumorale	65
Effetti molecolari dell'inibizione di HuR	68
Effetti di CMLD-2 sull'espressione di MAD2	68
Effetti del silenziamento di MAD2 sulla vitalità cellulare	71
Effetti del trattamento con CMLD-2 su cellule di tumore tiroideo over-esprimenti MAD2	73

DISCUSSIONE.....	76
BIBLIOGRAFIA.....	84

SINOSI

La regolazione dell'espressione genica rappresenta un processo fondamentale mediante il quale le cellule sono in grado di mantenere la normale omeostasi o di rispondere a stress provenienti dal microambiente cellulare. Tale regolazione accompagna tutta la vita dell'RNA, dalla sua trascrizione fino alla sua degradazione, controllando finemente processi chiave quali la biosintesi dell'RNA pre-messaggero, la sua maturazione, i fenomeni di splicing, la localizzazione subcellulare degli mRNA, la loro stabilità e l'inizio della traduzione.

Tutti questi punti di controllo prevedono l'intervento essenziale delle RNA binding proteins, proteine che sono in grado di riconoscere e legare gli mRNA fin dall'inizio della loro trascrizione, accompagnandoli poi in tutti i processi che ne caratterizzano il loro destino. Risulta quindi semplice comprendere come un'alterazione nell'espressione, nella funzione, o nell'interazione con gli mRNA target, di queste proteine possa portare ad errori nei meccanismi di controllo dell'espressione genica, determinando così l'insorgenza di numerose patologie, tra le quali il cancro.

In questa tesi mi sono occupato, in particolare, dell'RNA binding protein HuR, nota in letteratura come uno dei membri di questa categoria maggiormente coinvolto nella progressione tumorale. Sebbene il coinvolgimento di HuR sia stato largamente dimostrato in numerosi tipi di tumore umano, i dati riguardanti il suo ruolo nel tumore tiroideo sono ancora scarsi e non del tutto chiari. Per questo motivo in questo studio si è dimostrato, per la prima volta, come HuR giochi un ruolo chiave nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, così come nell'aggressività tumorale, nel tumore anaplastico tiroideo. Ci si è poi focalizzati sullo studio di un inibitore farmacologico di HuR. Ad oggi infatti le modalità di inibizione di tale RNA binding protein sono poche e presentano tutte delle criticità che ne hanno ostacolato la traslazione da studi *in vitro* o *in vivo* in modelli animali, a studi sull'uomo. Per

questo motivo sono stati valutati gli effetti di una nuova molecola di recente sintesi (CMLD-2) in grado di inibire direttamente l'interazione tra HuR e i siti ARE presenti sui suoi mRNA target. Gli esperimenti effettuati hanno confermato come CMLD-2 abbia effetti su vitalità cellulare, apoptosi ed aggressività tumorale in tipologie diverse di tumore tiroideo, inoltre hanno permesso di individuare uno dei probabili meccanismi di azione molecolari di tale trattamento che sembra coinvolgere la proteina MAD2. Quest'ultima è una componente chiave del complesso che regola il passaggio da metafase ad anafase durante la mitosi ed è già nota essere deregolata nel cancro.

I dati ottenuti in questo studio hanno quindi confermato come HuR sia un promettente target terapeutico nel trattamento del tumore tiroideo e come l'utilizzo di CMLD-2 possa essere ad oggi il metodo più promettente circa l'inibizione di questa RNA binding protein, il tutto in parte collegato alla down-regolazione di MAD2.

INTRODUZIONE

RNA binding proteins

Negli eucarioti la regolazione genica rappresenta un punto di controllo cruciale nella risposta fisiopatologica a stimoli intra o extra cellulari, sia essa rivolta verso il mantenimento dell'omeostasi e il differenziamento cellulare, o verso la risposta a stress e la sopravvivenza cellulare. Essa è il risultato di processi complessi e finemente regolati che si verificano in distretti cellulari diversi, ognuno dei quali prevede numerosi punti di regolazione, dalla biosintesi dell'RNA pre-messaggero nel nucleo, fino alla degradazione dell'RNA messaggero (mRNA) e al catabolismo proteico nel citoplasma. La regolazione dell'espressione genica a livello dell'mRNA coinvolge una continua organizzazione e riorganizzazione di strutture ribonucleoproteiche, ciò determina la necessità di numerose *RNA-binding proteins* (RBPs) le quali controllano ogni passaggio della "vita" di ciascuna molecola di RNA. L'esistenza di una molecola di mRNA viene spesso suddivisa in due fasi: una prima fase nucleare e trascrizionale ed una seconda fase citoplasmatica e post-trascrizionale. Questa suddivisione risulta ormai essere superata e non sorretta da recenti basi molecolari, per questo motivo si preferisce parlare di ciclo vitale dell'mRNA, un termine che sottolinea la continuità tra i vari passaggi del suo destino¹. Dal momento in cui inizia la loro trascrizione fino a quello in cui vengono degradati, la maggior parte degli mRNA risulta costantemente associata con proteine. Gli RNA presentano delle sequenze (*cis-elements*) che vengono riconosciute dalle RBPs, le quali possono legare sia sequenze codificanti che non codificanti interagendo con elementi strutturali specifici importanti per il destino dell'mRNA, influenzandone processamento, trasporto, localizzazione, stabilità e funzione. L'associazione tra RNA e proteina forma complessi ribonucleoproteici chiamati RNPs o più specificatamente mRNPs quando costituite da mRNA². Nel genoma umano sono stati identificati 1542 geni codificanti per RBPs, circa il

7,5% del totale di geni codificanti proteine, un numero destinato a salire ulteriormente e che chiarisce l'importanza che esse hanno all'interno delle cellule³⁻⁵. Le RBPs codificate da tali geni sono in grado di interagire con tutte le classi conosciute di RNA, in particolare sono 692 quelle in grado di legare molecole di RNA messaggero; si ritiene che circa il 50% di tutte le RBPs abbia un effetto diretto o mediato sulla regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica⁴. Le RNA-binding proteins possono essere classificate secondo le basi strutturali dei loro domini di legame con l'RNA (*RNA-binding domains* o RBDs). Ad oggi sono noti più di 600 RBDs diversi, essi sono spesso costituiti da 90 aminoacidi e comunque da un numero di residui amminioacidici compreso tra 60 e 100. La sequenza amminioacidica di tali domini ne determina la specificità di legame influenzandone la conformazione. La sequenza nucleotidica presente sull'RNA che viene riconosciuta dalle RBPs è solitamente costituita da 4 o 6 nucleotidi, anche se può essere più corta, fino ad un solo nucleotide. Il legame tra RNA e RBPs può coinvolgere sia molecole di RNA a singolo filamento che molecole a doppio filamento⁴. Tra i domini proteici delle RBPs più studiati troviamo: l'*RNA-binding domain* (RBD) (detto anche *RNA recognition motif* (RRM)), il *K-homology domain* (KH di tipo I e di tipo II); il *RGG* (Arg-Gly-Gly) *box*, il *Sm domain*, il *DEAD/DEAH box*, lo *zinc finger*, l'*RNA-binding domain* a doppio filamento (dsRBD), il *cold-shock domain*, il *Pumilio/FBF domain* (PUF); il *Piwi/Argonaute/Zwille domain* (PAZ) (Figura. 1)⁶.

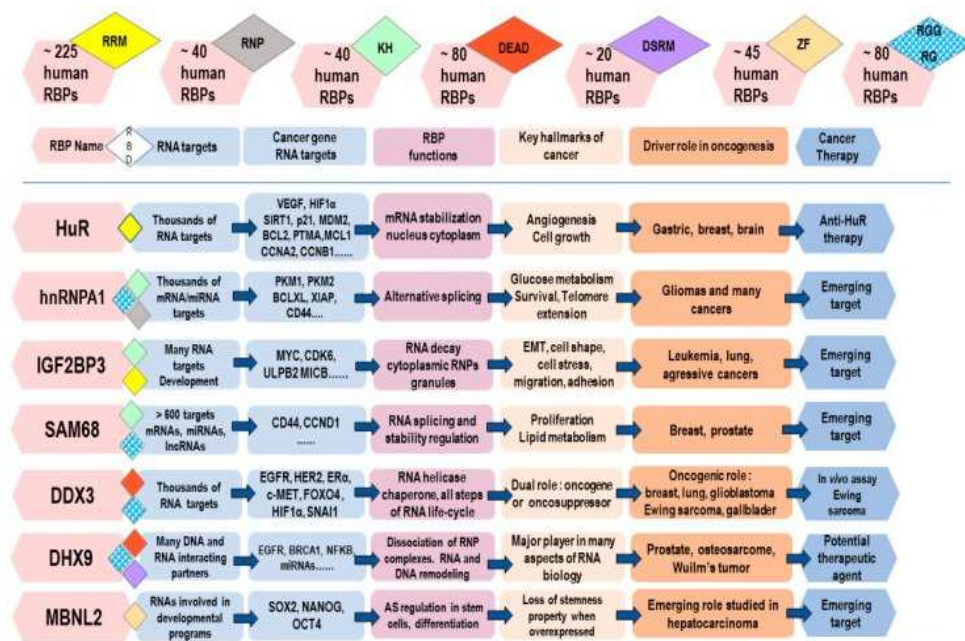


Figura 1. Relazione tra l'RNA-binding domain (RBDs), l'RNA-binding protein (RBPs), gli RNAs target e i processi biologici che vengono regolati con un focus particolare sul loro possibile coinvolgimento nella terapia del cancro¹.

Il dominio che si ritrova più frequentemente nelle RBPs, e quindi anche quello maggiormente studiato in letteratura, risulta essere l'*RNA recognition motif* o RRM. Tale dominio è caratterizzato da una sequenza di circa 90 aminoacidi con struttura secondaria ad $\alpha\beta$ -sandwich ($\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$), che gli consente di riconoscere e legare 2-8 nucleotidi di una molecola di RNA a singolo filamento. Le RBPs contenenti domini RRM risultano coinvolte in numerosi processi cellulari aventi come attore principale l'RNA come ad esempio le modifiche e l'elaborazione di mRNA e rRNA, la regolazione della traduzione, lo *splicing*, la localizzazione dell'RNA e la sua stabilità all'interno della cellula^{6,7}.

Il dominio dsRBD è costituito da 70-75 aminoacidi con struttura $\alpha\beta\alpha$ ed è coinvolto nel legame di RNA a doppio filamento. Questo tipo di dominio è estremamente importante in meccanismi di maturazione e localizzazione dell'RNA, ma soprattutto nei fenomeni di *RNA interference* e repressione della traduzione.

I domini *zinc finger* sono tra i più comuni DNA binding domain, inoltre sono anche in grado di riconoscere e legare l'RNA a singolo filamento. I domini *zinc finger* sono caratterizzati da una struttura $\beta\beta\alpha$ in cui i foglietti β e l' α -elica sono collegati attraverso un molecola di zinco⁷.

Negli eucarioti l'RNA neosintetizzato nel nucleo dalla RNA polimerasi II prende il nome di trascritto primario, esso va incontro ad un complesso processo di maturazione il quale prevede l'aggiunta di un *cap* all'estremità 5' e di una coda di poli-adenine all'estremità 3' oltre che la rimozione di sequenze introniche (*pre-mRNA splicing*). Questi processi avvengono nel nucleo e necessitano della mediazione di numerose RBPs le quali intervengono quindi sin dalla sintesi della nuova molecola di mRNA⁸⁻¹⁰. Lo *splicing* del *pre-mRNA* è il processo mediante il quale soltanto i segmenti codificanti del trascritto primario vengono uniti insieme e successivamente esportati nel nucleo¹¹. La maggior parte degli introni rimangono nel nucleo dove successivamente vengono degradati oppure processati e trasformati in *non-coding RNAs* con funzioni regolatorie. Lo *splicing* è un processo finemente controllato e svolto dallo spliceosoma, un grande complesso estremamente dinamico e continuamente rimodellato durante tutto il processo^{12,13}. Lo spliceosoma è composto da numerose piccole ribonucleoproteine (U1, U2, U4, U5 e U6) associate con cofattori proteici, ogni ribonucleoproteina è costituita da un RNA legato ad una proteina¹⁴. Il processo di *splicing* si basa sul riconoscimento da parte dello spliceosoma di corte sequenze conservate sul *pre-mRNA* in corrispondenza delle giunzioni tra introni ed esoni, detti siti di *splicing*¹⁵. Un complesso che prende il nome di *exon junction complex* (EJC) si posiziona a livello delle giunzioni tra esone ed esone rappresentando così un "marker" del processo di *splicing* ed influenzando il ciclo vitale futuro dell'mRNA condizionandone ad esempio l'esportazione del nucleo; esso rimane vi rimane legato fino al primo ciclo di traduzione dell'mRNA^{12,13}. Lo *splicing* può essere costitutivo quando un esone è sistematicamente incluso nell'mRNA mature, o alternativo quando, a partire da un dato *pre-mRNA*, possono essere prodotti diversi

trascritti che differiscono per gli esoni in essi inclusi. Ciò è possibile in quanto alcune sequenze presenti negli esoni o negli introni si comportano come regolatori positivi (*enhancers*) o negativi (*silencers*) dello splicing, richiamando delle RBPs che vi si legano. Tali sequenze vengono riconosciute e legate da *serine/arginine-rich* (SR) *proteins* che sono in grado di legare le sequenze enhancers o da *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs) le quali invece riconoscono i silencers, mediante il loro legame queste due classi di RBPs possono attivare o inibire lo splicing agendo sull'assemblaggio dello spliceosoma^{16,17}. La presenza di strutture secondarie sul pre-mRNA, inoltre, condiziona la velocità di elongazione della RNA polimerasi II; minore è tale velocità e maggiore è l'efficienza dello splicing alternativo, l'esone verrà quindi inserito nell'mRNA maturo (exon retention), viceversa invece si avrà un suo mancato inserimento (exon skipping)¹⁸. Durante le fasi iniziali della trascrizione, non appena la molecola di pre-mRNA raggiunge una lunghezza compresa tra i 20 ed i 30 nucleotidi, viene aggiunto un *cap* all'estremità 5' in modo da prevenire l'azione di degradazione normalmente svolta dalla 5'-3' esonucleasi. Tale *cap* consiste nella 7-metilguanosina la quale viene legata al primo nucleotide dell'mRNA attraverso l'azione di tre enzimi ed è coinvolto nello splicing e nell'esportazione dell'mRNA dal nucleo e nella traduzione¹⁹. L'mRNA presenta una semplice struttura che prende il nome di coda di poliA all'estremità 3' e che risulta costituita da una sequenza di adenine con lunghezza media tra le 200 e le 250 basi. La coda di poliA viene riconosciuta e legata da RBPs dette poly(A) binding proteins (PABPs) le quali proteggono la molecola di RNA dal clivaggio operato dalla 3'-5' esonucleasi e dall'azione della deadenilasi. La coda di poliA viene sistematicamente accorciata durante l'esistenza della molecola di mRNA fino ad essere rimossa al termine del suo ciclo vitale, la sua lunghezza quindi ha un impatto cruciale sul destino dell'mRNA ed è coinvolta nell'esportazione, nella stabilità e nella traduzione dell'mRNA¹⁹, oltre che nel controllo post-trascrizionale dell'espressione genica in fenomeni quali sviluppo, differenziamento e cancro²⁰⁻²². A partire da un singolo gene,

possono essere prodotti mRNA diversi attraverso l'utilizzo di segnali di poliadenilazione alternativi nella regione 3'terminale, ciò determina cambiamenti nella coda di poliA aggiunta. i quali portano ad una differente durata dell'emivita dell'mRNA, nonché ad una loro diversa localizzazione all'interno della cellula, modulando così l'espressione genica²³. Negli eucarioti l'mRNA intracitoplasmatico viene degradato principalmente attraverso due vie, entrambe le quali hanno inizio con la deadenilazione. La deadenilazione consiste in due passaggi, il primo coinvolge il complesso PAN2-PAN3 (*polyA nuclease 2 e 3*) il secondo che vede l'intervento del complesso CAF1-CCR4-NOT²⁴. Una volta deadenilato l'mRNA può.

- Venire degradato dall'estremità 3'verso quella 5'dall'esosoma, un complesso multiproteico che recluta RNAsi e cofattori e che viene regolato dal complesso SKI (*Sloan-Kettering Institute*).
- Subire la rimozione del *cap* catalizzata da DCP2 (*decapping protein 2*) e dal suo coattivatore DCP1. Dopo questo passaggio l'mRNA subisce una degradazione esonucleolitica in direzione 5'-3'svolta dalla esoribonucleasi XRN1²⁵.

La maggior parte dei trascritti viene degradata attraverso questi meccanismi dipendenti dalla deadenilazione, tuttavia sono state descritte vie alternative come il taglio endonucleolitico mediato da IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*)²⁶. Diversi sistemi di controllo della qualità dell'mRNA rendono possibile l'accesso al macchinario della traduzione dei soli trascritti che non presentino anomalie. La presenza di aberrazioni sull'mRNA viene rilevata durante la traduzione e ciò comporta la sua eliminazione attraverso l'attivazione di vie di segnalazione come la NMD (nonsense mediated decay) o la *non-EJC-dependent NMD mechanism*^{12,25,26}.

Tra gli elementi-*cis* noti per essere in grado di influenzare la stabilità dell'mRNA, gli *Adenylate-Uridylate-rich* (AREs) sono i più studiati e caratterizzati. Gli AREs sono dei siti caratterizzati dalla presenza di molteplici residui di adenina ed uracile e localizzati a livello delle regioni non tradotte al 3'di numerosi mRNA, inclusi quelli di fattori di crescita, citochine

e proto-oncogeni²⁷. L'influenza sulla stabilità dell'mRNA degli AREs dipende dalle ARE-binding proteins (ARE-BP) che vi si legano. Ad esempio la tristetrapolina (TTP) promuove una rapida degradazione dell'mRNA di GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), mentre HuR stabilizza il trascritto di VEGF²⁵. La stabilizzazione dell'mRNA mediate dalle ARE-BPs può essere determinata da un legame competitivo con fattori destabilizzanti che di conseguenza non possono legare l'mRNA ed attivarne la degradazione²⁶. Inoltre le ARE-BPs possono subire delle modificazioni post-traduzionali che ne influenzano l'affinità di legame per gli AREs o la localizzazione cellulare²⁸. L'effetto delle ARE-BPs sull'mRNA può essere influenzato anche da micro RNA che sono in grado di riconoscere e legare il medesimo trascritto della ARE-BP in modo cooperativo o competitivo²⁹. Le ARE-BPs sono in grado di controllare la traduzione dell'mRNA in due modi:

- Attraverso la degradazione della coda di poliA inducendo il rilascio delle PAPBPs
- Legando eIF4E e prevenendo così il suo legame con eIF4G

Inoltre in condizioni di stress, alcune ARE-BPs sono in grado di guidare l'mRNA verso granuli citoplasmatici (*stress granules* o SGs) nei quali i ribosomi si trovano legati sugli mRNAs in una condizione di stallo all'inizio della traduzione³⁰.

La down-regolazione di numerose ARE-BPs è stata riscontrata in vari tipi di tumore, ciò determina la stabilizzazione di mRNA targets coinvolti nel ciclo cellulare, nell'angiogenesi e nella resistenza all'apoptosi; ad esempio la down-regolazione di TTP nel cancro mammario rappresenta un fattore prognostico negativo³¹.

La famiglia delle RNA-binding proteins comprende numerosi membri come ad esempio le proteine Hu (HuA, HuR, HuB, HuC e HuD) le quali riconoscono e legano le sequenze Au-rich presenti nella regione del 3' non tradotto (3'UTR) dell'mRNA, incrementandone la stabilità e la traduzione^{32,33}. Altri membri di questa famiglia come TIA-1 (T-cell intracellular antigen 1), TIAR (TIA-1-related), tristetrapolina, FMRBP (polypyrimidine tract-binding protein), CUGBP

(fragile X mental retardation protein), PTB (CUG triple repeats RNA-binding protein), nucleolina e hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) A1, A2 e C1/C2, è stato dimostrato essere in grado di influenzare la stabilità dell'mRNA interagendo non solo con il 3'UTR ma anche con la regione codificante e con il 5'UTR³⁴⁻³⁷. Le proteine Hu sono tra le più caratterizzate e studiate RBPs, HuR è espresso ubiquitariamente in tutti i tessuti, mentre HuB, HuC, HuD sono espresse quasi esclusivamente a livello neuronale³⁸. HuR è anche nota con il nome di *embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila-like 1* (ELAV L1), essa lega mRNA aventi sequenze ricche in AU e U le quali sono considerate siti di legame o anche *RNA-recognition motifs* (RRMs) e sono presenti in numerosi trascritti³⁹. HuR lega mRNA coinvolti nella crescita cellulare, nella sopravvivenza cellulare, nella proliferazione, nella senescenza, nella risposta a stress e nella carcinogenesi, stabilizzandoli e promuovendone la traduzione⁴⁰⁻⁴⁴. L'RNA-binding protein *Au-binding factor 1* (AUF1), anche nota come *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D* (hnRNPD), si lega a sequenze ricche in Au prevalentemente localizzate al 3'UTR dei suoi mRNA bersaglio. AUF1 appartiene ad una grande famiglia di proteine hnRNPs tra le quali troviamo hnRNP A, B, C, D, E, F, H, I, K, L, M, Q, R e U. AUF1 promuove la degradazione di numerosi trascritti, ma è anche in grado di aumentare la stabilità di alcuni mRNA⁴⁵⁻⁴⁷. Questa RBP è presente a livello cellulare in 4 isoforme diverse (p37, p40, p42, p45) come risultato di uno splicing alternativo a partire dallo stesso gene, tutte le sue isoforme sono in grado di legare l'mRNA sebbene con diversa affinità⁴⁸. Si pensa che AUF1 presenti gli mRNA (coinvolti in processi quali ciclo cellulare, risposta allo stress e apoptosi) all'esosoma al fine di indurne la degradazione^{47,49,50}. Le RBPs TIA-1 e TIAR legano sequenze ricche in Au e U presenti al 3'UTR degli mRNA e ne sopprimono la traduzione⁵¹, tuttavia esse possono anche modulare l'espressione genica attraverso l'interazione con tratti di oligopirimidine presenti all'estremità 5' in risposta a cambiamenti dell'omeostasi cellulare⁵². Le proteine TIA-1 sono inoltre coinvolte nel controllo dello *splicing* alternativo del pre-mRNA attraverso il legame con

sequenze arricchite in uracile a livello degli introni e il riconoscimento di siti di *splicing* atipici. Le proteine TIAR sono in grado di legarsi fortemente al DNA a singolo filamento in corrispondenza di regioni ricche di timina; questo legame permette il posizionamento delle TIAR in modo tale da modulare la trascrizione e aiutare a localizzare TIAR in prossimità di trascritti con sequenze ricche di uracili al momento della trascrizione⁵¹. Tra le RBPs che svolgono la funzione di indurre la degradazione degli mRNA con i quali interagiscono troviamo anche il *nuclear-factor 90* (NF90) che media la soppressione di mRNA coinvolti nel ciclo cellulare⁵³; la proteina FMRP che è noto essere coinvolta nella modulazione di geni coinvolti nella regolazione della plasticità sinaptica⁵⁴ e la tristetraprolina (TTP), una proteina *zinc finger* che ha come trascritti bersaglio geni di numerose interleuchine, i quali risultano essere coinvolti in processi di infiammazione e carcinogenesi⁵⁵. La nucleolina è una RBP che interagisce con gli mRNA attraverso sequenze ricche in AU o in G e ne regola la stabilità e la traduzione. I geni i quali mRNA sono regolati da questa proteina sono coinvolti nel ciclo cellulare, nella morfologia cellulare, nella proliferazione e nella carcinogenesi³⁴.

Se la funzione della RBP è quella di facilitare ed attivare la degradazione dell'mRNA, come nel caso di AUF1 o TTP, si ha una riduzione dell'emivita della molecola di mRNA con conseguenti bassi livelli di espressione della proteina; viceversa, RBP che svolgano una funzione stabilizzante sugli mRNA come nel caso di HuR, determinano un aumento dell'emivita dei trascritti con conseguenti livelli proteici aumentati (Figura. 2).

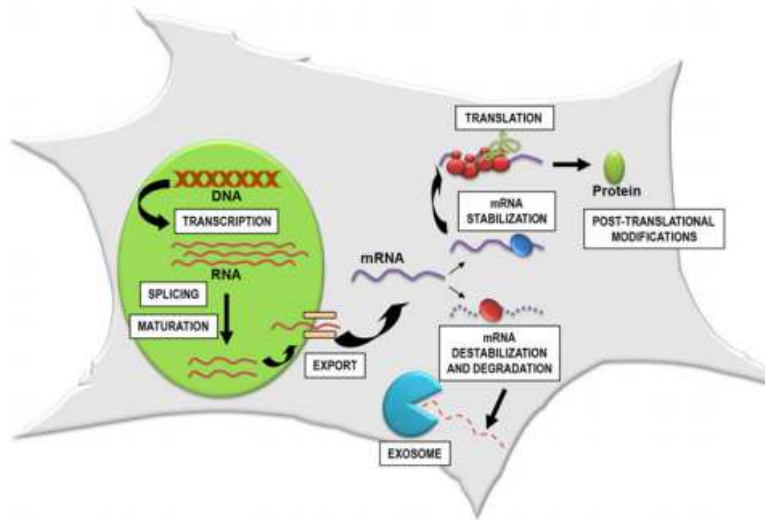


Figura 2. Regolazione della stabilità e della traduzione dell'mRNA ad opera delle RBP. Alcune RBP (in blu) stabilizzano l'mRNA favorendone la traduzione, altre (in rosso) ne favoriscono la degradazione mediata dall'esosoma.

Numerosi studi hanno dimostrato come le RBP siano deregolate in diverse malattie umane, incluso il cancro^{56,57}. Un'alterata espressione di queste proteine causa un'errata interazione con i loro mRNA target, portando alla formazione di complessi ribonucleoproteici aberranti a causa delle modificate affinità o concentrazioni. In questo modo tali complessi possono condizionare ogni processo post-trascrizionale e modificare il fenotipo cellulare in una condizione patologica⁵⁸. Mediante analisi di *genome-wide*, numerose RBP sono state individuate come proteine aventi un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione dei tumori. Esse possono influenzare la crescita e la proliferazione cellulare, inoltre una loro espressione aberrante è stata correlata con la sopravvivenza dei pazienti in vari tipi di cancro⁵⁹⁻⁶². Inaspettatamente, tuttavia, nel cancro non si osservano grandi cambiamenti nei livelli di espressione delle RBP⁶³, ciò induce a pensare che il loro ruolo nella tumorigenesi possa essere legato all'interazione con gli mRNA e che la loro deregolazione, in queste patologie, coinvolga alterazioni genetiche, meccanismi epigenetici e processi di regolazione mediati da RNA non codificanti^{64,65}. In seguito ad alterazioni di alcune RBP, le cellule tumorali

possono subire delle modificazioni nei processi di splicing, ad esempio come nel caso di mutazioni somatiche in geni che costituiscono lo spliceosoma come SF3B1, U5AF1 o le proteine hnRNP, trovate in oltre il 50% di pazienti con sindrome mielodisplastica e leucemia mieloide acuta^{66,67}. Una piccola alterazione in una sola RBP può deregolare l'intera espressione genica favorendo la crescita tumorale; è questo il caso di una mutazione germinale di DICER1 che risulta in un processo di maturazione dei microRNA difettoso, il quale porta ad un'anormale espressione degli mRNA target^{68,69}. Una traslocazione cromosomica che coinvolga geni di RBP può determinare proteine di fusione che favoriscano la progressione tumorale⁷⁰.

L'espressione aberrante delle RBP può anche essere il risultato di alterati meccanismi di controllo post-trascrizionali i quali coinvolgano RNA non codificanti o altre RBP. Il microRNA miR-328 interagisce e sequestra le RBP PCBP4 e hnRNPK ed in questo modo aumenta l'espressione di oncogeni come MYC e PIM1⁷¹. Alcuni microRNA oncosoppressori come miR-34a, miR-101, miR-128 e miR-138 sopprimono l'espressione della RBP Musashi-1 (MSI-1) in glioblastoma e medulloblastoma⁷². L'mRNA di MSI-1 presenta una lunga coda al 3' non tradotta contenente numerose sequenze ricche in AU e U, le quali possono venire legate da HuR che in questo modo stabilizza il trascritto mantenendo alti i livelli di espressione di MSI-1⁷³.

Nei tumori la funzione delle RBP può essere modificata anche mediante delle modificazioni post-trascrizionali come fosforilazione, metilazione, acetilazione ed ubiquitinazione⁷⁴. In vari tipi di cancro la funzione delle RBP viene modificata attraverso il legame covalente di gruppi funzionali o di altre proteine, ad esempio la fosforilazione della RBP hnRNP1 mediata da TGF- β /AKT2 attenua la sua attività soppressiva dei fenomeni invasivi e metastatici nel cancro mammario⁷⁵.

La funzione principale delle RBP nel cancro è quella di sostenere la proliferazione cellulare alterando l'espressione di regolatori positivi e negativi di tale fenomeno. La RBP SAM68 regola l'espressione genica di numerosi oncogeni a livello post-trascrizionale attraverso lo splicing alternativo degli mRNA^{59,76,77}. La fosforilazione di SAM68 ad opera di RAS/ERK promuove lo splicing dell'esone v5 dell'mRNA di CD44 stimolando così la proliferazione⁷⁸, inoltre SAM68 determina uno splicing alternativo della ciclina D1 nella sua isoforma D1b, reclutando alcuni componenti dello spliceosoma nel tumore della prostata⁷⁷. Anche la RBP L1TD1 promuove la proliferazione cellulare ed il *self-renewal*, stabilizzando l'RNA di LIN28 e determinando così un'up-regolazione di OCT4⁷⁹.

L'evasione dall'apoptosi rappresenta un altro importante meccanismo di sopravvivenza a stimoli extracellulari e farmaci citotossici per le cellule tumorali. Anche in questo processo alcune RBP giocano un ruolo cruciale regolando l'espressione di vari mRNA a livello post-trascrizionale. eIF4E regola i livelli di espressione di proteine coinvolte nella sopravvivenza cellulare tra cui BCL2 e BCL-XL⁸⁰. Anche le RBP della famiglia LARP sono coinvolte in fenomeni anti-apoptotici stabilizzando geni quali BCL2, BIK, BAX, MDM2 e XIAP⁸¹⁻⁸³. L'espressione della RBP CELF1 è stata trovata aumentata nel carcinoma squamocellulare orale, essa previene la morte cellulare programmata promuovendo la progressione tumorale. Questa proteina interagisce con il 3'UTR degli mRNA di BAD, BAX e JunD destabilizzandoli e reprimendo l'apoptosi⁸⁴.

Il tessuto tumorale necessita della generazione di nuovi vasi sanguigni che possano apportare nutrienti ed ossigeno alla massa neoplastica in accrescimento. In questo processo è coinvolta una RBP, la RBP2, che incrementa i livelli di espressione di VEGF attraverso la soppressione degli mRNA di alcuni inibitori ciclina-dipendenti delle chinasi nel tumore dello stomaco⁸⁵.

Quando agiscono come promotori tumorali le RBP sono anche in grado di promuovere l'invasione e la metastatizzazione. Le RBP IGF2BPs sono altamente over-esprese in vari tipi

di cancro ed è stato dimostrato come siano in grado di favorire l'attività invasiva delle cellule tumorali attraverso la stabilizzazione degli mRNA di CD44, CD164 e MMP9^{86,87}. I loro mRNA target facilitano il processo di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e la formazione di invadopodi determinando l'infiltrazione e la degradazione della matrice extracellulare. È stato dimostrato come la RBP hnRNPE1 possa legare il 3'UTR di alcuni mRNA mediando in tal modo il processo di EMT indotto da TGFβ e promuovendo la formazione di metastasi.⁷⁵

Studi recenti hanno dimostrato come l'evasione dell'immuno sorveglianza sia un importante elemento caratteristico dello sviluppo tumorale. La RBP IGF2BP3 determina l'elusione della risposta immunitaria favorendo la degradazione di ULPB2 e MICB, entrambi i quali sono mediatori fondamentali nella risposta delle cellule natural killer⁸⁸.

L'RNA BINDING PROTEIN HUR

HuR è una RNA-binding protein ubiquitariamente espressa della famiglia delle proteine ELAV (embryonic lethal, altered vision), e rappresenta uno dei regolatori più studiati nella determinazione della sorte di ciascuna molecola di mRNA. HuR modula numerosi effetti cellulari legando migliaia di mRNA target, partecipando alla regolazione dello splicing, influenzando la stabilità dei trascritti e soprattutto modulandone la traduzione⁸⁹. Negli ultimi anni sono stati individuate con precisione gli mRNA target di HuR ed è stato dimostrato come essa sia fondamentale anche per la regolazione di altre RBP^{90,91}. HuR interagisce con i suoi mRNA target mediante sequenze ricche in uridina o adenosina/uridina (AREs) le quali sono più frequentemente presenti nelle regioni non codificanti del trascritto come gli introni o la regione al 3' non tradotta (UTR). In condizioni normali HuR si trova principalmente localizzata nel nucleo, ma può passare nel citoplasma dove modula il processamento degli mRNA. La traslocazione ed il sequestro di HuR nel citoplasma si verifica in condizioni di stress cellulare come nel caso di radiazioni UV, deplezione di nutrienti o shock termico^{92,93}; in questo modo

essa può coordinare il turn-over di numerosi mRNA coinvolti nella risposta cellulare agli stress, al fine di assicurare la sopravvivenza della cellula⁹⁴. HuR ha un ruolo cruciale anche nella proliferazione e sopravvivenza cellulare⁴³, tuttavia in risposta a stress letali per la cellula, è in grado di promuovere l'apoptosi mediata da caspasi⁹⁵, per questo motivo la sua attività è fondamentale per la regolazione di vie di segnalazione che mediano la morte o la sopravvivenza cellulare.

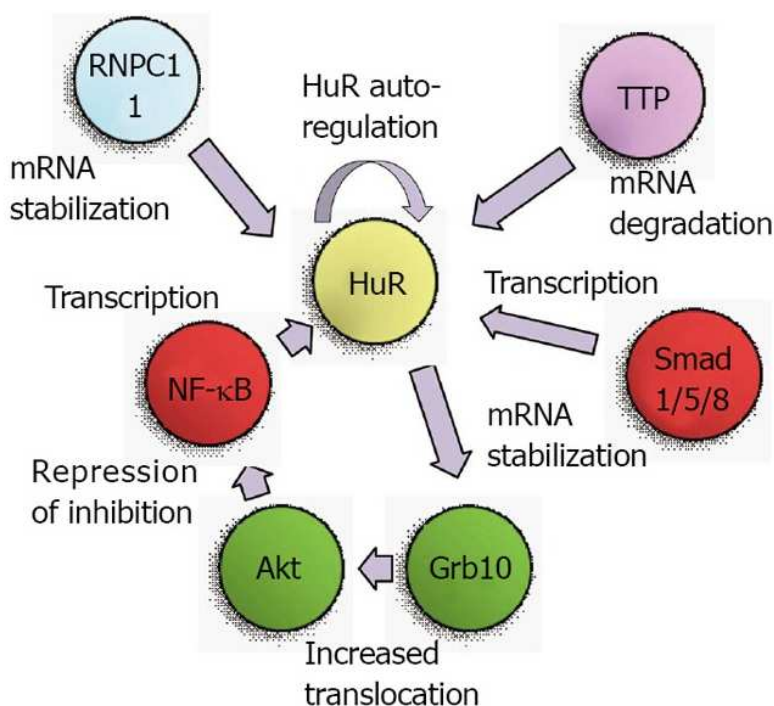


Figura 3. Regolatori traduzionali e post-traduzionali di HuR. TTP: tristetraprolina; Akt: chinasi B; NF-κB: Nuclear factor kappa B⁸⁹.

Il primo studio sulla regolazione genica di HuR fu portato a termine nel 2000 con l'isolamento e il sequenziamento della regione al 5' del gene murino di HuR. Nel 2008 *Kang et al* hanno dimostrato che l'espressione di HuR è modulata dalla via di segnalazione che vede coinvolti la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K), la proteina chinasi B (AKT) e NF-κB⁹⁶, trovando un sito di legame per NF-κB a livello del promotore di HuR, a 133 basi dal sito di inizio della trascrizione del gene, sebbene non ne sia stata identificata l'esatta sequenza. Un secondo livello di

controllo dell'espressione di HuR è dovuto all'utilizzo di due siti alternativi di inizio della trascrizione presenti sul suo gene, posti approssimativamente 150 e 20 basi a monte della regione codificante^{97,98}, i quali danno origine a due mRNA che differiscono al 5', uno più lungo ricco in G e C avente la possibilità di dar vita a numerose strutture secondarie, e uno più corto ricco in A e T in grado di formare poche strutture secondarie. Normalmente i due siti di inizio della trascrizione vengono utilizzati con la stessa frequenza, ma in condizioni di stress può essere incrementato l'utilizzo di quello che produce l'mRNA più corto⁹⁸. L'espressione di questi trascritti è regolata da siti di legame multipli per le proteine Smad 1/5/8, i quali si trovano al 5' del trascritto più lungo. Lo stress metabolico sembra quindi in grado di indurre l'espressione della forma più corta di mRNA di HuR la quale viene più rapidamente tradotta a proteina consentendole di attivare i processi di sopravvivenza cellulare^{89,99,100} (Figura 3).

Il gene di HuR codifica per due varianti di siti di poliadenilazione le quali danno origine; una ad un mRNA più lungo e meno stabile in quanto contenente regioni funzionali ARE, l'altra ad un mRNA più corto e più stabile grazie alla mancanza di ARE¹⁰¹. HuR è in grado di regolare se stesso attraverso un meccanismo di *feedback* negativo, la forma nucleare di HuR infatti lega il suo stesso pre-mRNA aumentando la produzione della forma più lunga e meno stabile, in questo modo la sua concentrazione si mantiene costante in condizioni fisiologiche. Viceversa, in condizioni di stress, la traslocazione di HuR verso il citoplasma fa venire meno tale meccanismo di controllo e i suoi livelli di espressione aumentano¹⁰². In alcune circostanze HuR può anche fungere da regolatore positivo di se stesso facilitando l'esportazione del proprio mRNA dal nucleo al citoplasma¹⁰³.

Studi più recenti hanno dimostrato il coinvolgimento della RBP RNPC1 come mediatore della stabilità dell'RNA messaggero di HuR. Anche RNPC1 può legare i siti ARE e regolare la stabilità e la traduzione del trascritto, è stato dimostrato che RNPC1 interagisce con il 3'UTR dell'mRNA di HuR stabilizzandolo, tuttavia non è ancora del tutto chiaro se la sequenza riconosciuta sia

la stessa legata da HuR¹⁰⁴. Anche la RBP tristetrapolina (TTP) è in grado di legare l'mRNA di HuR promuovendone la degradazione¹⁰⁵, più in generale, la regolazione della stabilità del trascritto di HuR è mediata da siti di legame multipli per numerose RBP e la loro azione dipende dallo stato in cui si trova la cellula.

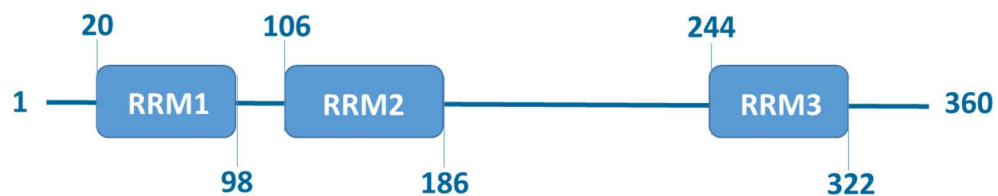


Figura 4. Rappresentazione schematica della proteina HuR e dei suoi tre domini RRM.

La proteina HuR è composta da 360 aminoacidi, ha un peso molecolare di circa 36 kDa e la sua struttura è caratterizzata da tre RNA *recognition motif* calssici (RRMs). HuR svolge la sua funzione di RBP riconoscendo e legando gli ARE di classe I e II presenti sui suoi mRNA target mediante l'interazione con i suoi RRM. I siti ARE mediano una rapida degradazione degli mRNA, costituendo così un importante meccanismo di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica; l'interazione di HuR a livello di tali siti determina quindi una stabilizzazione dell'mRNA con conseguente traduzione della proteina da esso codificata. Gli RRM 1 e 2 sono situati all'estremità N-terminale della proteina e mediano il legame selettivo agli elementi AREs, mentre l'RRM3 favorisce il legame con la coda di poli(A) degli mRNA target o di altri ligandi^{27,106}.

HuR è soggetta a più livelli di regolazione post-traduzionale, il primo dei quali riguarda la traslocazione della proteina dal nucleo verso il citoplasma. I livelli citoplasmatici di HuR e la possibilità di legare i suoi mRNA target sono sotto il controllo di fosforilazioni operate da chinasi diverse, come Chk2 (*checkpoint kinase 2*), Cdk1, p38 e PKC³², inoltre , anche la metilazione di HuR mediata da CARM1 (co-activator-associated arginine methyltransferase 1) può modularne l'attività¹⁰⁷. I meccanismi attraverso i quali HuR viene esportato dal nucleo al

citoplasma sono ancora oggetto di studio, una delle modalità attraverso la quale tale traslocazione si verifica coinvolge la regione di collegamento tra RRM2 e RRM3 nella quale è stato individuato un dominio di trasporto (HNS). Un altro meccanismo di traslocazione nucleocitoplasmatica di HuR avviene attraverso altri macchinari di trasporto, come le trasportine e il *chromosome region maintenance* 1¹⁰⁸.

Numerosi stimoli di stress cellulare possono indurre il passaggio di HuR dal nucleo al citoplasma, tra questi troviamo l'esposizione alla radiazione ultravioletta (UVC), il lipopolisaccaride (LPS), composti chimici, alterazioni del microambiente, citochine, infezioni virali e trattamenti ormonali¹⁰⁶ (Tabella 1).

Tabella 1. Fattori esterni che regolano l'espressione e le funzioni di HuR

Regolatori	Effetto su HuR
UVR	Accumulo citoplasmatico ↑
Etanolo	Accumulo citoplasmatico ↑
LPS	Accumulo citoplasmatico ↑
SAHA	Proteina ↓
Tamoxifene	Accumulo citoplasmatico ↑
Gemcitabina	Accumulo citoplasmatico ↑
Ossido Nitrico	mRNA ↓, proteina ↓
Inibitore della HIV-proteasi	Accumulo citoplasmatico ↑
Inibitore del proteosoma MG132	Accumulo citoplasmatico ↑
Ipossia	Accumulo citoplasmatico ↑
Carenza di aminoacidi	Accumulo citoplasmatico ↑
Sali biliari	Accumulo citoplasmatico ↑
Siero	Accumulo citoplasmatico ↑
Privazione di poliammine	Accumulo citoplasmatico ↑
DHA	Accumulo citoplasmatico ↑
Tè verde	Accumulo citoplasmatico ↓
Estratto di Ginkgo-biloba	Accumulo citoplasmatico ↓
KPS-A	Accumulo citoplasmatico ↓

Triptolide	Accumulo citoplasmatico ↓
IL 1 β	Accumulo citoplasmatico ↑
TNF α	Accumulo citoplasmatico ↑
TGF β1	Accumulo citoplasmatico ↑
HPV	Accumulo citoplasmatico ↑
Alphavirus	Accumulo citoplasmatico ↑
ACTH	Accumulo citoplasmatico ↑
Androgeni	Accumulo citoplasmatico ↑
17-β Estradiolo	Accumulo citoplasmatico ↑

I meccanismi di regolazione più importanti dei livelli proteici di HuR risultano tuttavia essere la sua degradazione e il suo taglio proteolitico; uno shock termico lieve è in grado di ridurre rapidamente la concentrazione di proteina senza alterare i livelli di mRNA né la sua traduzione. Questa diminuzione di HuR è stato dimostrato essere dovuta ad una proteolisi mediata da ubiquitina, in questo modo si ha un incremento della sopravvivenza cellulare come conseguenza dell'alterata stabilità degli mRNA target di HuR¹⁰⁹. La degradazione di HuR mediata da proteolisi ubiquitina-dipendente è caratteristica anche delle cellule tumorali soggette ad inibizione della glicolisi, la quale rappresenta la principale chance di proliferazione in condizioni di scarse riserve energetiche cellulari¹¹⁰.

Leggeri stress cellulari inducono un aumentata traslocazione di HuR dal nucleo verso il citoplasma dove può interagire con i propri mRNA target ed incrementare la sopravvivenza cellulare, viceversa, stimoli letali per la cellula, seppur favorendo comunque tale traslocazione, attivano anche il clivaggio di HuR, mediato da caspasi, una volta che l'RBP abbia raggiunto il citoplasma¹¹¹. Inoltre, uno dei prodotti del taglio proteolitico di HuR, è stato dimostrato essere in grado di legare il 3'UTR di alcuni mRNA target inibendone la traduzione, come nel caso di c-myc o favorendone l'espressione come nel caso della caspasi 9, è evidente quindi che il clivaggio di HuR in condizioni di stimoli letali, determina un cambiamento della

sua funzione che passa da pro-proliferativa a pro-apoptotica^{84,95}. Nella Tabella 2 sono elencati i principali regolatori endogeni che influenzano l'espressione e le funzioni di HuR ad oggi conosciuti.

Tabella 2. Regolatori endogeni dell'espressione e delle funzioni di HuR¹⁰⁶

Regolatori	Meccanismo	Siti di legame	Effetto su HuR
NF-κB	Trascrizione	Promotore	HuR mRNA \uparrow
Smad	Trascrizione	Promotore	HuR mRNA \uparrow
PKC α	Fosforilazione	S158, S221	Legame dell'RNA \uparrow , Accumulo citoplasmatico \uparrow
PKC δ	Fosforilazione	S318, S221	Legame all'RNA \uparrow , Accumulo citoplasmatico \uparrow
Cdk1	Fosforilazione	S202	Accumulo citoplasmatico \uparrow
Chk2	Fosforilazione	S88, S100, T118	Legame dell'RNA \uparrow
P38-MAPK	Fosforilazione	T118	Accumulo citoplasmatico
PI3K-AKT	Trascrizione	Promotore	Legame di p65/RelA al promotore di HuR \uparrow
AMPK	Trascrizione	K22, S105 dell'importina α 1	Importazione nucleare HuR \uparrow
miR-9	Trascrizione	Sconosciuto	mRNA \downarrow , Proteina \downarrow
	Post-trascrizionale	3'UTR	
miR-200c	Sconosciuto	Sconosciuto	Interazione HuR-mRNA \downarrow
miR-34a	Post-trascrizionale	3'UTR	HuR mRNA \downarrow , Proteina HuR \downarrow
miR-16	Traduzione	3'UTR	Proteina \downarrow
miR-125a	Traduzione	3'UTR	Proteina \downarrow
miR-519	Traduzione	3'UTR	Proteina \downarrow
CARM1	Metilazione	R217	Legame dell'RNA \uparrow , Accumulo citoplasmatico \uparrow
HuR	Ubiquitinizzazione	K182	Stabilità proteina \uparrow
	Post-trascrizionale	Sito di poliadenilazione	Stabilità mRNA \uparrow

Hu (B-D)	Post-trascrizionale	Sito di poliadenilazione	Stabilità mRNA ↑
TTP	Post-trascrizionale	3UTR	Stabilità mRNA ↓
pp32	Interazione		Legame all'RNA ↓
RNP C1	Post-trascrizionale	RRM, 3UTR	Legame all'RNA ↑, Stabilità mRNA ↓
Mdm2	Ubiquitinizzazione	K283, K313, K326	Stabilità proteina ↑
Hsf1	Sconosciuto		Proteina ↑

Il gene ELAVL1 codificante per HuR è situato sul cromosoma 19p13.2, una regione frequentemente correlata con varie traslocazioni e mutazione oncogeniche come quelle che coinvolgono i geni del recettore delle cellule T¹¹², della dinamina 2¹¹³ e di molecole coinvolte nell'adesione intracellulare¹¹⁴. Numerosi studi basati su tecniche di immunoistochimica, RT-PCR e Western blot, hanno confermato come in vari tipi di cancro i livelli citoplasmatici di HuR risultino particolarmente elevati¹⁰⁶. Studi clinici hanno dimostrato, inoltre, che la presenza di cellule di tumore mammario con elevati livelli citoplasmatici di HuR appare correlata con le dimensioni del tumore, con recettori per estrogeni e progesterone negativi e con un più alto grado di malattia^{115,116}. Risultati simili sono stati ottenuti anche per il tumore della cervice uterina¹¹⁷ e per il carcinoma polmonare non a piccole cellule¹¹⁸; per entrambi HuR è stata correlata sia con lo stadio che con il grado della patologia tumorale.

Lo stato di espressione di HuR nelle neoplasie maligne è apparentemente correlato con la sua espressione nei tessuti normali e nelle lesioni pretumorali. I tessuti normali, le lesioni precancerose ed il tessuto tumorale mostrano profili di espressione di HuR distintivi, ad esempio la comparazione tra lesioni pre-tumorali a basso e alto grado indotte da HPV e tumore della cervice, mostra un aumento dell'espressione di tutte le RBP nelle lesioni neoplastiche¹¹⁹⁻¹²¹. Questi dati dimostrano come la traslocazione di HuR dal nucleo al citoplasma, così come la sua presenza nel citoplasma, siano fondamentali per lo svolgimento

delle sue funzioni in numerosi tipi di cancro. Il meccanismo con il quale HuR media la carcinogenesi non è stato ancora del tutto chiarito, tuttavia la sua azione stabilizzante esercitata su numerosi mRNA è necessaria per lo sviluppo tumorale¹⁰⁶.

Un importante fattore legato alla carcinogenesi è rappresentato dalla ciclossigenasi 2 (COX-2), un enzima inducibile coinvolto nella sintesi delle prostaglandine le quali sono state largamente studiate in relazione al fatto che HuR regoli la loro espressione aberrante specialmente nel tumore dello stomaco e nel cancro del colon-retto. Tali studi mostrano una differenza significativa dello stato di espressione di COX-2 e HuR tra lo stadio precoce del tumore dello stomaco e la fase avanzata della neoplasia¹²², una differenza simile a quella rinvenuta tra epitelio normale, neoplasia prostatica intraepiteliale e carcinoma della prostata¹¹⁹. L'aumento della localizzazione citoplasmatica di HuR è stato osservato nel 76% degli adenomi e nel 94% degli adenocarcinomi, mentre nei tessuti normali i livelli di HuR erano molto bassi, risultati simili sono stati ottenuti in altri tipi di cancro. HuR compete con TTP per il legame con l'mRNA di COX-2, di conseguenza un aumento dell'espressione di HuR o della sua concentrazione citoplasmatica alterano tale equilibrio portando ad un'espressione aberrante di COX2 durante la tumorigenesi¹²³.

HuR riconosce tra gli altri mRNA di oncogeni, cicline, chinasi ciclina-dipendenti, metiltransferasi, fattori infiammatori e fattori pro-apoptotici¹⁰⁶, inoltre è anche responsabile della regolazione degli oncosoppressori p21 e Went-5a (una proteina della famiglia Wnt)^{124,125}.

HuR nelle neoplasie

Le cellule tumorali possono promuovere la crescita di vasi e l'angiogenesi con diversi meccanismi, l'angiogenesi a sua volta contribuisce alla crescita della massa tumorale e favorisce l'ingresso nella circolazione sanguigna delle cellule neoplastiche. Il fattore di crescita endoteliale A (VEGF-A), l'interleuchina 8 (IL-8), HIF- α e COX2 hanno un ruolo predominante nel controllo dei processi che regolano la costruzione di nuovi vasi¹²⁶, questi fattori sono a loro volta regolati principalmente a livello post-trascrizionale. Numerosi studi clinici hanno dimostrato una correlazione positiva tra un accumulo citoplasmatico di HuR e l'espressione di VEGF-A¹²⁷, VEGF-C¹²⁸, COX-2¹²⁹ e IL-8¹³⁰ in campioni tumorali, inoltre un aumento dei livelli citoplasmatici di HuR è stato correlato anche con un aumento della densità dei microvasi¹¹⁸.

Le cellule tumorali sono in grado di invadere i tessuti adiacenti così come di entrare nella circolazione periferica in modo da raggiungere e proliferare in organi distanti dal tumore primitivo, soprattutto a livello di polmoni, fegato, ossa e cervello. Studi clinici hanno dimostrato che l'aumento della concentrazione citoplasmatica di HuR è associata alla presenza di metastasi linfonodali nel tumore non a piccole cellule del polmone¹²⁸ e nel carcinoma del colon¹³¹; inoltre tale aumento mostra una correlazione anche con l'avanzamento della malattia¹¹⁶.

HuR favorisce l'invasione metastatica regolando l'espressione di geni coinvolti nei processi invasivi come uPA¹³² e il suo recettore e Snail¹³³, un fattore di regolazione fondamentale nella modulazione della transizione epitelio-mesenchimale. Oltre a fattori intracellulari HuR regola l'aggressività tumorale anche mediante il controllo di proteine extracellulari come nel caso della metallo-proteinasi 9 (MMP-9), la quale risulta sotto il controllo di questa RBP¹³⁴.

Recentemente è stato dimostrato il coinvolgimento di HuR nello sviluppo della resistenza ai chemioterapici osservata in alcuni tipi di tumore. Ad esempio, nella linea cellulare di tumore mammario MCF-7, l'aumento della concentrazione citoplasmatica di HuR è stato proposto

come un fattore cruciale per l'acquisizione della resistenza al tamoxifene; HuR è infatti in grado di stabilizzare mRNA di proteine coinvolte nella farmaco-resistenza e nella successiva attivazione delle vie di segnalazione delle MAPK e JNK¹³⁵. L'attività di HuR è inoltre un fattore che partecipa allo sviluppo della resistenza a farmaci anche nel glioma, attraverso l'aumentata espressione di BCL-2¹³⁶, un'azione simile viene svolta anche nel tumore dello stomaco, del pancreas e del polmone, mediata probabilmente da un'aumentata espressione della tubulina beta-3 (TUBB3)^{137,138}.

HuR ha un ruolo anche nella regolazione delle sensibilità a farmaci. Costantino et al. hanno dimostrato come HuR medi l'efficacia della gemcitabina attraverso la stabilizzazione dell'mRNA di un enzima fondamentale nel suo metabolismo, la deossicitidina chinasi. Una maggior espressione di tale enzima favorisce l'attivazione della gemcitabina che viene metabolizzata nelle forme attive di- o tri-fosfato¹³⁹. Latorre et al. hanno studiato il ruolo di HuR durante la risposta cellulare alla doxorubicina. I loro risultati hanno dimostrato che cellule MCF-7 doxorubicina-resistenti mostrano aumentati livelli di espressione del trasportatore di membrana ABCG2 e una down-regolazione di HuR¹⁴⁰.

L'inibizione di HuR

Come fin qui argomentato, HuR risulta essere deregolata in numerosi tipi di cancro, attraverso meccanismi vari che coinvolgono sia alterazioni geniche che epigenetiche, mediate da RNA non codificanti e modificazioni post-traduzionali. Tale alterata regolazione finisce per influenzare ogni singolo *step* dello sviluppo e della progressione tumorale, favorendo la proliferazione cellulare, la resistenza all'apoptosi, l'evasione dal sistema immunitario, l'angiogenesi, la capacità metastatica e la resistenza al trattamento con farmaci anticancro. Risulta quindi chiaro come HuR debba essere considerato un promettente bersaglio nella terapia di diversi tipi di tumore. A tale scopo sono stati testati alcuni metodi di inibizione

dell'attività di tale RBP, sia utilizzando siRNA, sia testando piccole molecole con funzione inibitoria, con lo scopo di ridurre l'affinità di legame tra HuR e i suoi mRNA target.

Alcuni studi hanno utilizzato molecole liposomiali contenenti oligonucleotidi antisenso specifici per HuR e legate con il recettore della transferrina o del folato. In questo modo è stato possibile dimostrare come l'inibizione di HuR induca una riduzione della vitalità cellulare, della migrazione e dell'invasività di cellule tumorali di tumore del polmone^{141,142}. Wu et al hanno messo a punto un sistema ad alto rendimento per la selezione e l'identificazione di numerosi nuovi composti in grado di distruggere il legame tra HuR e i propri mRNA bersaglio. Questi composti sono in grado di bloccare il legame HuR-mRNA a basse concentrazioni, in tal modo possono essere utilizzati come trattamenti terapeutici in tumori che mostrino un aumento dell'espressione o dell'attività di HuR¹⁴³.

Nonostante molti ricercatori abbiano tentato di sviluppare metodi di inibizione di HuR, i successi sono stati limitati soprattutto a causa delle difficoltà nello sviluppare un trattamento specifico contro HuR o che possa specificatamente inibire la sua interazione con gli mRNA target⁵⁸.

Un'alternativa è quella di inibire gli effettori a valle di HuR come ad esempio MYC, il cui mRNA viene legato e stabilizzato da HuR e che a sua volta è in grado di regolare i livelli di HuR^{144,145}. Poiché MYC gioca un ruolo fondamentale nella progressione tumorale di numerosi tipi di cancro, quella di bloccare l'attività oncogenica di HuR attraverso l'inibizione dell'espressione o dell'attività del suo target MYC, sembra essere una buona strategia. Molecole come i-BET, JQ1 e MMS417 si sono dimostrate essere dei repressori trascrizionali di MYC in grado di ridurre la progressione tumorale^{146,147}.

I TUMORI TIROIDEI

Pur essendo una patologia neoplastica poco diffusa (circa l'1% di tutti i tumori umani), il cancro della tiroide rappresenta la più frequente neoplasia endocrina e la sua incidenza è in aumento negli ultimi decenni^{148,149}. Tale aumento può essere parzialmente spiegato con un incremento nelle diagnosi dovuto ai miglioramenti nell'utilizzo dell'ecografia come strumento diagnostico, tuttavia, poiché gran parte dei nuovi casi sono rappresentati da tumori differenziati e di grandezza variabile, la sovra-diagnosi non può essere l'unica spiegazione di tale fenomeno, rendendo necessario un approfondimento circa nuovi fattori di rischio emergenti¹⁵⁰. I fattori di rischio del tumore tiroideo noti sono le radiazioni ionizzanti, la carenza di iodio e una storia familiare predisponente^{151,152}. Recentemente a questi sono stati associati anche fattori di rischio ambientali e modificazioni nello stile di vita, i quali possono spiegare il recente incremento di questo tipo di tumori¹⁵³.

Il sintomo più frequente del tumore tiroideo è rappresentato dalla comparsa di tumefazioni o noduli ghiandolari, tuttavia tali condizioni non sempre sono legate ad una neoplasia tiroidea, ma più spesso sono dovute ad un'iperplasia benigna, basti pensare che soltanto nel 5% dei casi i noduli sono associati alla presenza di un tumore.

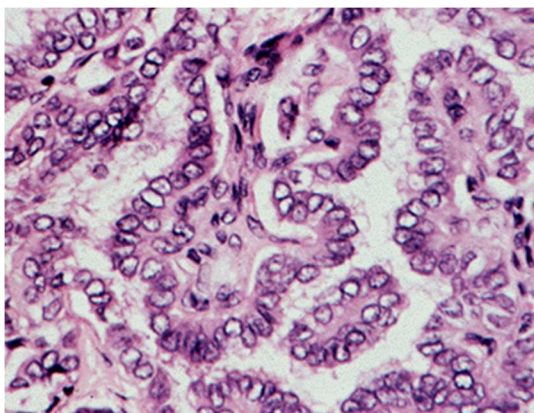
Il tumore tiroideo origina da cellule epiteliali e viene classificato in 4 gruppi principali:

- 1) Carcinoma tiroideo papillifero (PTC)
- 2) Carcinoma tiroideo follicolare (FTC)
- 3) Carcinoma tiroideo indifferenziato (PDTC)
- 4) Carcinoma tiroideo anaplastico (ATC)

Il carcinoma follicolare (FTC)(15% dei casi) e il carcinoma papillifero (PTC)(80% dei casi) originano entrambi da cellule follicolari e sono anche definiti come carcinomi differenziati, dallo stesso tipo di cellule originano anche il carcinoma anaplastico (ATC)(2% dei casi) e il

cancro a cellule di Hurtle (HCC, 3% dei casi), un sottotipo che seppur compreso nei follicolari, viene spesso classificato a parte a causa di un aspetto istologico caratteristico e di una scarsa responsività alle terapie standard. Il carcinoma tiroideo midollare (MTC) si differenzia dagli altri in quanto origina da cellule tiroidee parafollicolari¹⁵⁴.

Il carcinoma papillifero è il tumore tiroideo più frequente, nonché quello caratterizzato da una migliore prognosi, in particolare quando al momento della diagnosi non vi sia ancora presenza di metastasi. A livello istologico i PTC solitamente non presentano capsula e nonostante tendano a rimanere localizzati possono dare metastasi ai linfonodi adiacenti la lesione. In questo tipo di tumore le cellule cancerose crescono raccolte attorno ad un nucleo di tipo fibrovascolare formando così strutture papillifere e follicolari.



*Figura 5. Sezione istologica di carcinoma papillifero tiroideo (E/E)
(<http://www.pathologyoutlines.com>).*

Il tumore papillifero può presentare anche delle alterazioni nucleari a livello delle cellule neoplastiche; nel 20% dei casi infatti si possono osservare foci multipli distribuiti nel parenchima ghiandolare.

Il carcinoma follicolare ha origine dallo stesso tipo cellulare del PTC, e può essere o meno circondato da capsula, la quale non rappresenta comunque una barriera efficace per le cellule tumorali che possono invaderla metastatizzando poi per via ematica in distretti lontani come

polmoni e ossa. Istologicamente presenta delle strutture follicolari molto ben definite e di norma è caratterizzato dalla presenza di noduli solitari di dimensioni superiori a quelli del PTC.

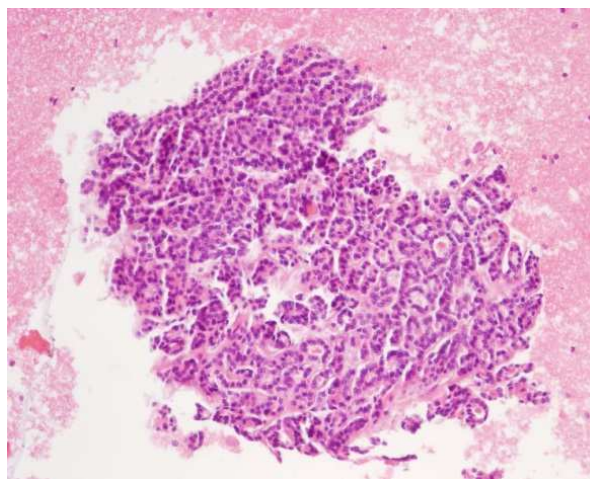


Figura 6. Sezione istologica di carcinoma tiroideo follicolare (<http://www.aipvet.it>).

Sia PTC che FTC sono caratterizzati da una crescita piuttosto lenta e da una buona prognosi, infatti la sopravvivenza a 5 anni è del 98% per questo tipo di tumori. Anche per quanto riguarda i MTC, tumori che spesso mostrano caratteristiche neuroendocrine, la prognosi risulta spesso favorevole, con una sopravvivenza a 10 anni che raggiunge il 75%^{155–157}. Questo tipo di tumore origina dalle cellule parafollicolari o cellule C calcitonina-secrenti; le cellule neoplastiche mostrano una maggior secrezione di calcitonina, per tale motivo il dosaggio di questo ormone rappresenta un classico marker tumorale.

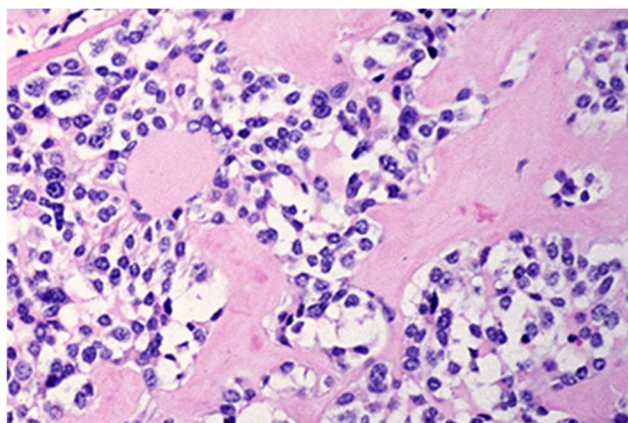


Figura 7. Sezione istologica di carcinoma midollare della tiroide (MTC)(E/E) (<http://pathologyoutlines.com/topic/thyroidmedullary.html>)

Il tumore midollare ha origine sporadica nella maggior parte dei casi (80%) tuttavia può avere anche una base ereditaria in circa il 20% dei casi. La forma ereditaria viene trasmessa in modo autosomico dominante a seguito di mutazioni germinali a carico del protooncogene RET codificante per un recettore tirosin-chinasico. Il carcinoma midollare familiare della tiroide (FMTC) può manifestarsi singolarmente o in presenza della sindrome endocrina multipla di tipo 2 (MEN 2).

Il carcinoma anaplastico della tiroide (ATC)

Il carcinoma anaplastico della tiroide rappresenta l'1-2% di tutti i tumori tiroidei, anche se a causa della sua rarità, la sua reale incidenza non è nota, sebbene sia stato riportato essere più elevata in Europa piuttosto che negli USA¹⁵⁸. Attualmente la sua incidenza è stimata essere di circa 1-2 casi ogni milione di persone ogni anno, con un picco durante la sesta e settima decade di vita, infatti la maggior parte dei pazienti ha più di 50 anni¹⁵⁹. Nonostante il carcinoma anaplastico sia molto raro e rappresenti meno del 2% delle neoplasie tiroidee, è responsabile del 14-39%¹⁶⁰ di tutti i decessi associati ai tumori della tiroide, con una sopravvivenza media che si attesta a soli 5-6 mesi e con soltanto il 10-15% di pazienti che arrivano al secondo anno dopo la sua insorgenza¹⁶¹. Sebbene il numero di carcinomi tiroidei differenziati sia in costante aumento negli ultimi 20 anni, l'incidenza dell'ATC parrebbe essere diminuita, ciò appare essere dovuto sia alla diagnosi precoce di piccoli tumori della tiroide resa possibile dalla diffusione dell'ecografia come strumento diagnostico, sia all'aumento dei livelli di iodio assunti con la dieta, il quale ha ridotto l'incidenza del gozzo, a sua volta correlato all'ATC¹⁶². La riduzione dell'incidenza di tale neoplasia può essere spiegata inoltre con i miglioramenti delle tecniche di immunoistochimica che hanno reso possibile la riclassificazione di molti casi di ATC come linfomi o carcinomi midollari tiroidei scarsamente differenziati¹⁶³.

Tutti i casi di ATC vengono classificati come tumori di stadio T4, suddivisi poi in ulteriori sottostadi:

- IVA (T4a): i tumori sono intra-tiroidei senza coinvolgimento dei linfonodi né metastasi a distanza (N0 e M0).
- IVB (T4b): il tumore primario mostra una grande estensione extra-tiroidea con coinvolgimento dei linfonodi ma senza metastasi a distanza.
- IVC (T4c): i pazienti mostrano metastasi a distanza (M1).

Tra i fattori di rischio per il carcinoma anaplastico della tiroide sono riportati un'età maggiore di 65 anni, l'esposizione del collo e del petto a radiazioni e la presenza per un lungo periodo di gozzo. Sono fattori prognostici avversi un'età maggiore di 60 anni, sesso maschile e il coinvolgimento della regione extra-tiroidea da parte del tumore, infatti donne al di sotto dei 65 anni con tumori piccoli e senza metastasi a distanza mostrano una prognosi favorevole¹⁶⁴. I sintomi più frequenti di ATC sono localizzati e dovuti alla compressione meccanica esercitata dalla massa in accrescimento come raucedine, dolore cervicale, disfagia, dispnea e stridore. Circa il 97% dei pazienti presenta un rapido ingrossamento della massa tiroidea che può andare dai 3 fino ai 20 cm per quanto riguarda le dimensioni, mentre tende a raddoppiare in volume ogni settimana. I linfonodi cervicali sono interessati in circa il 40% dei pazienti, così come le altre strutture anatomiche adiacenti risultano spesso invase dal tumore, come nel caso di muscoli (65%), trachea (46%) esofago (44%) e laringe (13%) (fig).



Figura 8. Sezione assiale di una TAC con contrasto in paziente con ATC. E' evidente la grande massa tumorale che coinvolge muscoli ed esofago, la freccia indica la trachea compressa e dislocata.
Molinaro et al, Nature Reviews Endocrinology, 2017

I sintomi sistemici comprendono anoressia e perdita di peso, spesso sono presenti anche difficoltà respiratorie, relate alla presenza di metastasi polmonare. Metastasi a distanza vengono riscontrate nel 50% dei pazienti al momento della diagnosi, mentre circa il 25% dei pazienti sviluppa metastasi nel corso della malattia. L'organo più comunemente interessato risulta essere il polmone (nell'80% dei casi), seguito dalle ossa (6-16%) e dal cervello (5-13%). La rapidissima progressione locale dell'ATC comporta il soffocamento come prima causa di morte nei pazienti affetti^{165,166}.

L'istopatologia dell'ATC varia da paziente a paziente e spesso anche a livello intra-tumorale, questi tumori generalmente contengono un insieme eterogeneo di cellule fusate, cellule epitelioidi e cellule giganti pleomorfe, il che complica notevolmente la diagnosi (fig).

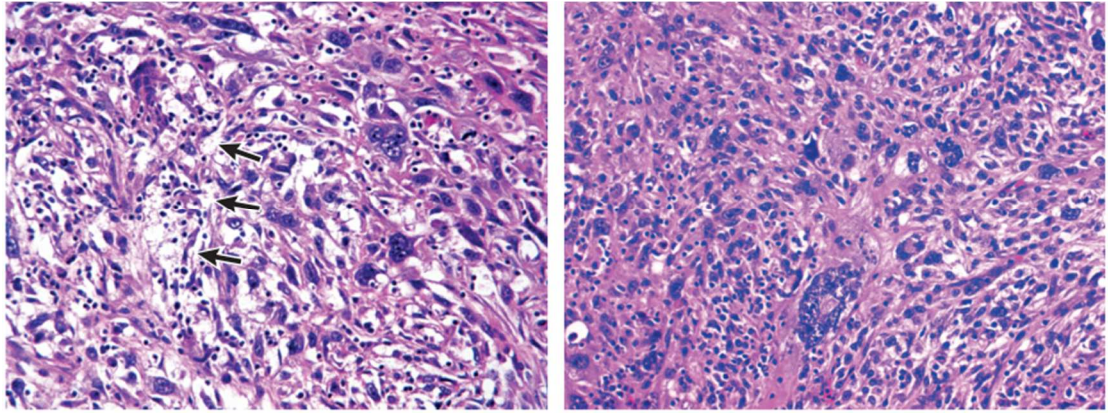


Figura 9. Colorazione con ematossilina ed eosina di diversi patterns istologici di carcinoma anaplastico della tiroide. A) Cellule neoplastiche fusate e pleomorfiche giganti (le frecce indicano un'infiltrazione linfocitaria nello stroma). B) cellule neoplastiche pleomorfiche giganti. Molinaro et al, Nature Reviews Endocrinology, 2017.

Nell'ATC l'immunoistochimica viene comunemente utilizzata per stabilirne il grado di differenziazione epiteliale, tuttavia l'assenza di immunoreattività per markers epiteliali non esclude la diagnosi di ATC. I più comuni markers epiteliali positivi sono gli anticorpi diretti contro le citocheratine a basso peso molecolare, come CAM, anticorpo che riconosce le citocheratine 8, 18 e 19.

La tiroglobulina è una molecola importante per lo stoccaggio dello iodio, nonché il substrato per la produzione degli ormoni tiroidei T3 e T4; essa viene prodotta e secreta esclusivamente dalle cellule tiroidee. L'immunoreattività della tiroglobulina negli ATC è ancora controversa, la sua positività varia infatti dallo 0 al 50% ed è spesso caratterizzata da una positività debole ed ambigua¹⁶⁷. L'interpretazione della colorazione con anticorpi anti-tiroglobulina può essere errata a causa della presenza di cellule non neoplastiche "sequestrate" a livello del fronte invasive. I follicoli rimasti inclusi nel fronte del tumore secernono tiroglobulina che diffonde poi nel citoplasma delle cellule neoplastiche dando così una falsa positività¹⁶⁸.

Un altro marker di differenziamento tiroideo è il fattore di trascrizione tiroideo (TTF1), esso si trova nel nucleo delle cellule follicolari tiroidee dove regola l'espressione genica di

tiroglobulina, tiroperossidasi (TPO), recettore del TSH (TSHR) e NIS. La sua valenza come marker di differenziamento è dovuta al fatto che solo raramente si trova espresso in ATC.

Risulta molto importante distinguere un ATC da un carcinoma tiroideo scarsamente differenziato (PDTC) in quanto l'approccio terapeutico e le probabilità di sopravvivenza sono sostanzialmente differenti per questi diversi tipi di tumore. Il PDTC è considerato l'anello di congiunzione tra i carcinomi differenziati e gli ATC sia a livello morfologico che di aggressività. Rispetto all'ATC il PDTC mostra una popolazione cellulare più omogenea mentre non mostra pleomorfismo, inoltre la necrosi appare meno estesa e più localizzata in piccole aree rispetto ad una sua più vasta ed omogenea distribuzione riscontrabile negli ATC.

La teoria del passaggio da carcinomi differenziati ad ATC attraverso il passaggio per PDTC viene confermata a livello immunoistochimico, con cheratine, tiroglobulina e TTF1 che sono largamente espressi nei tumori ben differenziati, meno espressi nei PDTC e del tutto assenti (soprattutto tiroglobulina e TTF1) negli ATC¹⁶⁴.

La progressione tumorale degli ATC viene attribuita ad un de-differenziamento progressivo a partire da lesioni tipiche di carcinomi tiroidei differenziati¹⁶⁹. Tale ipotesi è supportata dal fatto che mutazioni riguardanti i geni BRAF, NRAS e HRAS e che hanno una frequenza di circa il 60%, 8.5% e 3.5% rispettivamente, nei tumori differenziati, si trovano più frequentemente in ATC che contengono aree tumorali di carcinomi differenziati piuttosto che in ATC che non le contengano. La mutazione BRAFV600E è stata riscontrata in entrambe le componenti (ATC e DTC) dello stesso tumore, il che la rende un'alterazione avente un ruolo importante nello sviluppo di un ATC a partire da un preesistente DTC. In tal senso è ipotizzabile che il processo di de-differenziamento sia dovuto al probabile accumulo di mutazioni somatiche in geni coinvolti nello sviluppo tumorale come ad esempio TP53 e altri geni codificanti per proteine coinvolte nella via di segnalazione della fosfatidil-inositolo 3 chinasi-AKT (PI3K-AKT)¹⁷⁰.

Negli ultimi anni alcuni studi hanno utilizzato un approccio di sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) per descrivere lo scenario genomico e trascrizionale degli ATC, in questo modo è stato possibile dimostrare che questo tipo di carcinomi sono caratterizzati dall'accumulo di numerose alterazioni oncogeniche¹⁷¹⁻¹⁷³ (Tabella 3).

Il gene più frequentemente mutato in ATC è TERT, il quale codifica per la trascrittasi inversa facente parte del complesso della telomerasi e che risulta essere altamente espressa nella maggior parte dei tumori umani. Le mutazioni coinvolgono la regione del promotore e risultano spesso associate ad altre alterazioni geniche. Un'altra alterazione fondamentale negli ATC risulta essere l'inattivazione di TP53, la quale ricorre più frequentemente nei casi BRAF-positivi. Quando un tumore tiroideo presenta sia una regione istologica differenziata che una non differenziata, le mutazioni su TP53 sono localizzate alla regione non differenziata, questo rafforza l'idea che l'inattivazione di TP53 sia un passaggio chiave nell'evoluzione da DTC a ATC¹⁷⁴.

Un'altra mutazione coinvolta nello sviluppo di ATC è quella a carico del gene EIF1AX che risulta implicato nell'inizio della traduzione eucariotica. Anche in questo caso mutazioni di EIF1AX sono correlate alla progressione da DTC (in particolare carcinoma follicolare) ad ATC in virtù del fatto che tali mutazioni sono strettamente legate a quelle riguardanti il gene RAS¹⁷¹.

La rapidità che caratterizza la progressione degli ATC richiede un immediato coinvolgimento multidisciplinare che comprenda chirurghi, radioterapisti, oncologi ed endocrinologi. Le opzioni terapeutiche utilizzabili sono la chirurgia, la radioterapia e/o la chemioterapia; un approccio intensivo che preveda la resezione chirurgica, la sensibilizzazione radioterapica e una chemioterapia adiuvante sembrano in grado di migliorare il controllo locale del tumore e la sopravvivenza in pazienti aventi ATC localizzati e confinati ad una piccola regione della tiroide.

Tabella 3. Alterazioni molecolari identificate in ATC. (ND: non individuato, SNV: variante a singolo nucleotide). Molinaro et al, Nature Reviews Endocrinology, 2017.

Gene	Number of SNVs			Total
	Landa et al. (2016) ⁴⁵ MSK-IMPACT 33 cases	Jeon et al. (2016) ⁶⁷ OncoPanel V2 11 cases	Kunstman et al. (2015) ⁶⁶ Whole exome 22 cases	
'Classic' ATC-related genes				
ATM	3 (9%)	0	0	3/66 (4.5%)
BRAF	15 (45%)	10 (90%)	6 (27%)	31/66 (47%)
CDKN1B	ND	0	1 (4.5%)	1/33 (3%)
CDKN2C	ND	0	1 (4.5%)	1/33 (3%)
CTNNB1	0	0	1 (4.5%)	1/66 (1.5%)
PIK3CA	6 (18%)	2 (18%)	2 (9%)	10/66 (15%)
PTEN	5 (15%)	1 (9%)	0	6/66 (9%)
RAS	8 (24%)	1 (9%)	7 (32%)	16/66 (24.2%)
TERT	24 (73%)	0	0	24/66 (36.4%)
TP53	24 (73%)	8 (72%)	6 (27%)	38/66 (57.6%)
'Novel' ATC genes				
ANKLE	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
ATR	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
BUB1	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
CBLC	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
CLTC	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
CREBBP	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
CUBN	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
DAXX	ND	0	1 (4.5%)	1/33 (3%)
EIF1AX	3 (9%)	ND	3 (13.5%)	6/55 (11%)
EP300	0	1 (9%)	0	1/66 (1.5%)
ERBB2	0	0	1	1/66 (1.5%)
ERBB2IP	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
ERCC4	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
ERCC5	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
EZH2	0	1 (9%)	0	1/66 (1.5%)
FANCA	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
GOPC	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
HECTD1	ND	ND	3 (13.5%)	3 (13.5%)
IL6ST	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
INSRR	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
MAGI2	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
MAP2K4	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
MAP3K1	ND	0	1 (4.5%)	1/33 (3%)
MLH1	ND	0	1 (4.5%)	1/33 (3%)
MLH3	ND	ND	1 (4.5%)	1/22 (4.5%)
MLL2 (KMT2D)	ND	0	1 (4.5%)	1/33 (3%)
MSH5	ND	ND	1 (4.5%)	1/22 (4.5%)
MSH6	0	0	1 (4.5%)	1/66 (1.5%)
MSN	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
NF1	3 (9%)	0	2	5/66 (7.5%)
NF2	2 (6%)	3 (27%)	1 (4.5%)	6/66 (9%)
NOTCH2	0	0	1 (4.5%)	1/66 (1.5%)
NSD1	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
PFAS	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
PKHD1	ND	2 (18%)	0	2/33 (6%)
PML	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
PTCH1	ND	0	1 (4.5%)	1/33 (3%)
RAD51B	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
RANBP2	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
RASAL1	ND	ND	1 (4.5%)	1/22 (4.5%)
RET	0	0	1 (4.5%)	1/66 (1.5%)
SETD2	ND	0	1 (4.5%)	1/33 (3%)
SF3B1	0	0	1 (4.5%)	1/66 (1.5%)
SMARCB1	0	0	1 (4.5%)	1/66 (1.5%)
SYNE1	ND	1 (9%)	0	1/33 (3%)
TRAF7	ND	ND	1 (4.5%)	1/22 (4.5%)
TSHR	2 (6%)	0	1 (4.5%)	3/66 (4.5%)
USH2A	ND	ND	4 (18%)	4/22 (18%)
STK11	2 (6%)	0	0	2/66 (3%)
RB1	3 (9%)	0	0	3/66 (4.5%)
MEN1	1 (3%)	0	0	1/66 (1.5%)

Tuttavia questo tipo di approccio è stato dimostrato essere inefficace in pazienti con forme di ATC avanzate e metastatiche (stadio IVC)¹⁶⁵, i quali ricevono i maggior benefici da cure palliative, le quali rimangono il principale metodo di gestione clinica in caso di ATC¹⁶¹. La resezione chirurgica, quando possibile, deve avere l'obiettivo di rimuovere macroscopicamente il tumore e permettere una pulizia microscopica dei margini, una effettiva resezione curativa si traduce in una sopravvivenza media di 43 mesi contro i 3,3 mesi nel caso di resezione chirurgica palliativa o nel caso di chemioterapia e radioterapia¹⁷⁵.

La radioterapia esterna (sia con regime standard che iperfrazionato) riduce sia la morbidità che la mortalità dovute a complicazioni regionali come il soffocamento, favorisce il ritardo nella ricorrenza locale e previene l'ostruzione toracica. Tuttavia i suoi effetti benefici sono localizzati alla zona del tumore e non sono in grado di modificare i rischi di mortalità nei pazienti, è comunque utile in associazione a chirurgia e chemioterapia nel prolungare la sopravvivenza a breve termine in alcuni pazienti¹⁷⁵. La radioterapia iperfrazionata (in cui la dose totale di radiazioni viene suddivisa in dosi più piccole ed il trattamento viene ripetuto più volte al giorno) con una dose di radiazioni media di 45-50 Gy è stato dimostrato facilitare la resezione chirurgica radicale¹⁷⁶.

Per quanto riguarda la chemioterapia, le classi di agenti più efficaci nel trattamento degli ATC sono i tassani (Paclitaxel e Docetaxel), le antracicline (Doxorubicina) e i sali di platino (Cisplatino e Carboplatino). La Doxorubicina ha rappresentato il trattamento principale, sebbene non sia in grado di superare il 20% di risposta nei pazienti con ATC in stadio avanzato (IVB) quando usata da sola¹⁷⁷. Il suo utilizzo in combinazione con i tassani o i Sali di platino ha invece dimostrato essere maggiormente efficace nel ridurre la massa tumorale, ed in particolare quando utilizzata in combinazione con il cisplatino, trattamento combinato che ha infatti rappresentato la chemioterapia standard per pazienti con ATC per molti anni. Attualmente viene utilizzato anche un approccio terapeutico che prevede la sola

somministrazione di Paclitaxel e che ha mostrato un'efficacia paragonabile ai trattamenti con combinazioni di farmaci¹⁷⁸.

Nonostante gli sforzi fatti nella ricerca di nuovi agenti chemioterapici o di nuove combinazioni di farmaci in grado di modulare la progressione degli ATC, non sono stati ancora ottenuti risultati clinici significativi, per tale motivo è necessaria un'ulteriore ricerca di nuovi agenti chemioterapici in grado di migliorare la sopravvivenza dei pazienti affetti da ATC.

HuR IN TIROIDE

L'RNA binding protein HuR risulta essere un importante attore nel complesso processo di tumorigenesi, infatti è stato dimostrato essere deregolata in numerose tipologie di tumori umani.

Nel 2016, Baldan et al., hanno valutato l'espressione e la delocalizzazione di HuR nei tumori tiroidei attraverso un'analisi istologica di tessuti tiroidei tumorali e non¹⁷⁹. Attraverso questo studio è stato dimostrato come la proteina HuR fosse localizzata prevalentemente a livello nucleare in entrambe le tipologie di tessuto, siano essi sani o tumorali e come a livello quantitativo HuR fosse maggiormente espressa nei tessuti tumorali rispetto a quelli sani (Figura 10). Inoltre, in tutti i campioni di tumori tiroidei maligni si riscontrava un incremento significativo della frazione citoplasmatica di HuR, in particolare nei PTCs dove essa risultava 5 volte più espressa rispetto ai tessuti normali nonostante una forte eterogeneità tipica di questo tipo di neoplasie. In questo modo è stato quindi dimostrato come anche nei tumori tiroidei vi sia un'over-espressione di HuR e una sua delocalizzazione citoplasmatica, suggerendo il possibile coinvolgimento dell'RBP anche nella tumorigenesi tiroidea.

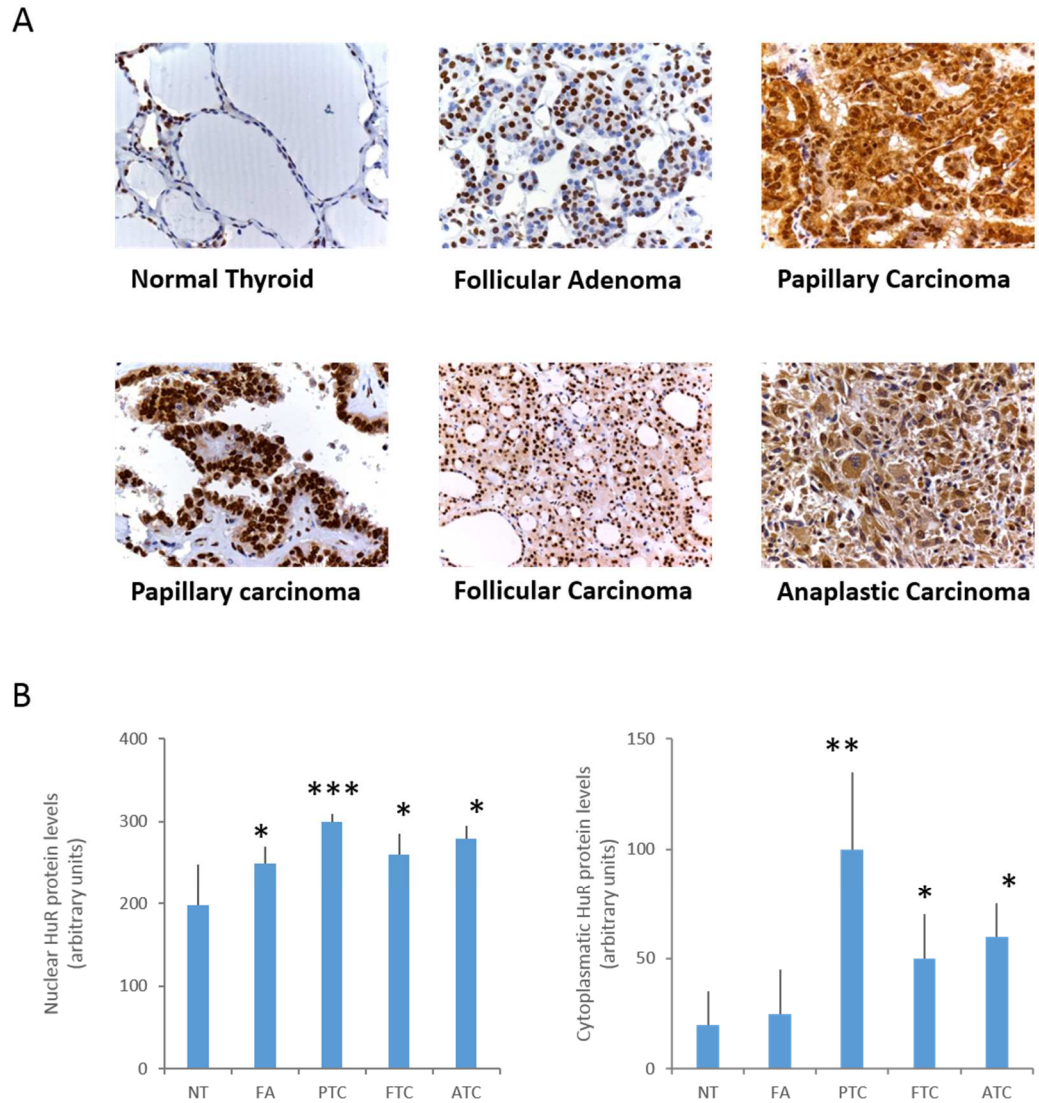


Figura 10. Espressione di HuR nei tumori tiroidei. Pannello A: immagini rappresentative dell'espressione di HuR in tessuto tiroideo normale, FAs, PTCs, FTCs e ATCs. Pannello B: quantificazione dell'espressione di HuR nei tessuti normali e tumorali di tiroide ottenuta mediante IHC score. I risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ calcolato mediante one-way ANOVA.

SCOPO DELLA TESI

Il controllo dell'espressione genica è un meccanismo fondamentale con il quale le cellule sono in grado di rispondere agli stimoli provenienti dal microambiente. Uno dei più importanti step di regolazione di tale processo è la regolazione post-trascrizionale, esercitata dalla cellula sugli mRNA appena trascritti. Le RNA binding proteins sono attori chiave di questo complicato meccanismo di regolazione, attraverso la loro interazione con gli mRNA la quale ne determina tra gli altri, localizzazione sub-cellulare, stabilità, splicing e livelli di traduzione.

È ormai ben noto come una loro alterata espressione, così come modificazioni della loro attività, si riscontrino in numerosi tipi di tumore umani, e tra tutte, una delle RNA binding proteins maggiormente coinvolta nello sviluppo delle neoplasie risulta essere HuR.

In questo progetto di dottorato abbiamo voluto studiare gli effetti dell'espressione e dell'attività di HuR in un modello di tumore anaplastico tiroideo. A questo scopo abbiamo silenziato mediante siRNA l'espressione di questa proteina valutandone gli effetti sia in termini di vitalità e sopravvivenza cellulare, sia in termini di aggressività cellulare.

Avendo dimostrato per la prima volta come HuR abbia un ruolo fondamentale nello sviluppo di un tumore così aggressivo come quello anaplastico tiroideo, ci siamo focalizzati sullo studio di una sua possibile strategia di inibizione farmacologica. Per questo motivo abbiamo valutato gli effetti del trattamento con CMLD-2, un inibitore di HuR di recente messa a punto, su linee cellulari di tumore tiroideo.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

In questo studio sono state utilizzate le linee cellulari umane BCPAP e K1, derivanti da carcinoma tiroideo papillifero; SW1736 e 8505C, derivanti da carcinoma anaplastico, e le Nthy-ori-3.1, una linea immortalizzata di epitelio follicolare tiroideo. Tutte le linee cellulari utilizzate in questa tesi sono state validate mediante l'analisi dei microsatelliti (STR – short tandem repeats). È stata inoltre verificata, mediante PCR, l'assenza di contaminazione da micoplasma. Le linee cellulari sono state cresciute in RPMI-1640 o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionati con 10% di siero bovino fetale (FBS), glucosio 4.5 g/L, L-glutamina 4 mM e gentamicina (50 mgr/ml). Le cellule sono state cresciute a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Preparazione di estratti proteici

L'estrazione delle proteine totali delle cellule Nthy-ori-3.1, BCPAP, K1, SW1736 e 8505C è stata effettuata lisando il pellet cellulare con *Total lysis buffer* (Tris-HCl pH 7.6 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, Sodio Deossicolico 0.5%, SDS 0.1%) addizionato con PMSF (Sigma) e un cocktail di inibitori delle proteasi. Il lisato è stato centrifugato a 14000g per 10 minuti. Il surnatante è stato raccolto e quantizzato mediante saggio di Bradford (Bio-Rad).

L'estrazione delle proteine citosoliche e nucleari delle linee cellulari SW1736 e 8505C è stata effettuata utilizzando due tamponi a diversa forza ionica. Il tampone T1 (HEPES pH 7.9 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 0.1 mM, EDTA pH 8 0.1 mM) è un buffer ipo-osmotico che induce il rigonfiamento delle cellule fino alla rottura della membrana plasmatica, con conseguente rilascio in soluzione delle proteine citoplasmatiche. La membrana plasmatica e i nuclei sono stati fatti sedimentare sottoponendo il lisato cellulare a centrifugazione a 800g per 10 minuti.

Il surnatante contenete le proteine citoplasmatiche è stato raccolto, mentre il pellet è stato risospeso, incubato per 30 minuti con il tampone ipertonico T2 (HEPES pH 7.9 20 mM, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA pH 8 0.1 mM, glicerolo 5%) e sottoposto a centrifugazione a 15000g per 20 minuti. Il surnatante contenete le proteine nucleari è stato raccolto e quantizzato mediante saggio di Bradford (Bio-Rad).

Western Blot

Gli estratti proteici sono stati separati mediante elettroforesi su gel di acrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE).

Il “gel di compattazione” (stacking gel) è un gel di poliacrilammide al 4% p/v in acrilammide, Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 0.1% p/v. Il “gel di separazione” (running gel) è costituito da poliacrilammide al 10%, in Tris-HCl 375 mM, pH 8.8, SDS 0.1% p/v.

Gli estratti proteici sono stati incubati a 95°C per 10 minuti dopo aver aggiunto il buffer di caricamento (Tris-HCl pH 6.8 1 M, Glicerolo 10%, SDS 2%, blu di Bromofenolo 0.001%, βmercaptoetanolo 2%). La corsa è stata condotta nel tampone di corsa (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% p/v) inizialmente ad un amperaggio di circa 0,5 mA per cm di gel, in seguito, durante la fase di separazione, ad un amperaggio di circa 1 cm per gel.

Successivamente è stato utilizzato il metodo dell'elettrotrasferimento ad umido mediante tank transfer unit (Amersham). Sono stati disposti nell'ordine, dal catodo all'anodo: due fogli di carta 3MM (Whatman), il gel di poliacrilammide, una membrana di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH) e altri due fogli di carta 3 MM. Il trasferimento è stato effettuato in 2 ore a 200mA e 70 V nella soluzione di trasferimento (Tris 50mM, glicina 40mM, Metanolo 20% v/v).

La membrana di nitrocellulosa è stata incubata con la soluzione di saturazione (latte scremato in polvere 5% p/v, tween-20 0,1% v/v in PBS) per 1 ora in lenta agitazione.

Il foglio di nitrocellulosa è stato incubato con gli anticorpi primari e secondari secondo i tempi e le diluizioni indicate in Tabella 1.

Tabella 1: Diluizioni e tempi di incubazione con gli anticorpi

PROTEINA	ANTICORPO PRIMARIO	DILUIZIONE TEMPO INCUBAZIONE	ANTICORPO SECONDARIO	DILUIZIONE TEMPO INCUBAZIONE
HuR	RIPAb+ HuR – RIP Antibody (Millipore)	1:500 O.N. a 4°C	Anti-rabbit	1:4000 1h 30' RT
Actina	Anti-actina (Abcam)	1:1000 O.N. a 4°C	Anti-rabbit	1:4000 1h 30' RT
C-Parp	Anti-cleaved Parp (Abcam)	1:1000 O.N. a 4°C	Anti-rabbit	1:4000 1h 30' RT
MAD2	Anti-MAD2 (Santa Cruz biotechnology)	1:1000 O.N. a 4°C	Anti-mouse	1:4000 1h 30' RT

Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario, le membrane sono state lavate per 3 volte per 5 minuti in PBS Tween 0,1% e poi i blot sono stati sviluppati utilizzando la procedura di chemiluminescenza ECL Super Signal (Pierce). La quantizzazione della proteina di interesse è stata normalizzata rispetto alla quantità di proteina β -actina totale dopo rilevamento dell'intensità delle bande mediante video densitometro Uvitec Alliance con il programma UViband software (Uvitec, Cambridge, UK).

Trasfezione cellulare e silenziamento

Il fenomeno dell'*RNA interference* o RNAi è un processo biologico tramite il quale piccole molecole di RNA inibiscono l'espressione genica attraverso la degradazione di specifici mRNA.

Le molecole *small interfering RNA* (siRNA) sono composte da circa 20-25 basi e vengono prodotte attraverso clivaggio enzimatico di lunghe molecole di RNA a doppio filamento (dsRNAs) ad opera dell'endoribonucleasi Dicer. I siRNA prodotti da Dicer vengono legati dal complesso *RNA-induced silencing complex* (RISC). La molecola di RNA a singolo filamento del siRNA funge da template a RISC che è così in grado di individuare la molecola mRNA complementare. Una volta trovata, Argonata, una proteina facente parte del complesso RISC, viene attivata e va a clivare l'mRNA.

Tipicamente i siRNA sintetizzati per il silenziamento genico sono molecole di RNA a doppio filamento di 21 nucleotidi, che mimano il prodotto di Dicer e quindi non necessitano di essere processati dall'enzima. Nel nostro laboratorio abbiamo invece deciso di utilizzare molecole di RNA a doppio filamento lunghe 27 nucleotidi, che necessitano quindi del processamento ad opera di Dicer. È ormai noto che questa metodica risulta essere notevolmente più efficiente rispetto all'utilizzo di siRNA "tradizionali".

Il silenziamento transiente di HuR è stato condotto sulle linee cellulari SW1736 e 8505C utilizzando il kit TriFECTa RNAi (Integrated DNA Technologies Inc, Coralville, IA, USA) specifico per il silenziamento di HuR o di MAD2. Gli oligonucleotidi (siRNA) sono stati trasfettati alla concentrazione di 5 nM utilizzando il reagente di trasfezione DharmaFECT 1 (GE Healthcare Dharmacon Inc.) secondo le istruzioni del produttore. Come controllo è stato utilizzato un oligonucleotide che ha come target una sequenza non presente nel trascrittoma umano. Il giorno prima della trasfezione, le cellule sono state piastrate in mezzo di coltura privo di antibiotico. Il giorno della trasfezione i siRNA e la DharmaFECT sono stati diluiti separatamente in terreno privo di siero ed antibiotici ed incubati per 5 minuti a temperatura

ambiente. Successivamente le soluzioni contenenti i siRNA e la DharmaFECT sono state unite ed incubate a temperatura ambiente per 20 minuti, in modo da permettere la formazione dei complessi reagente-siRNA. La soluzione così ottenuta è stata addizionata a terreno fresco e somministrata alle cellule da trasfettare. Dopo 72 ore di trasfezione, le cellule sono state raccolte e l'efficienza del silenziamento genico è stata valutata mediante l'analisi dei livelli di proteina HuR o MAD2, in Western Blot.

MTT-assay

Il saggio per misurare la vitalità cellulare utilizza il sale di tetrazolio (MTT) la cui riduzione enzimatica, da parte dei mitocondri delle cellule vitali, previa internalizzazione da parte delle stesse, produce dei cristalli viola di formazano. Questo fenomeno è un segno dell'attività ossidoreduttasica e quindi dello stato redox delle cellule.

Le linee cellulari SW1736, 8505C sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 3200 cellule per pozzetto. Il giorno successivo il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo contenente DMSO o mezzo addizionato con CLMD-2 (1, 5, 10, 25, 35, 50, 75 μ M) oppure con siRNA, come da protocollo descritto in precedenza. Tre ore prima del termine del trattamento, in ciascun pozzetto è stato aggiunto l'MTT (4 mg/ml) al 10% v/v. Le cellule sono state quindi lisate con 100 μ l di dimetil-solfossido (DMSO). La lettura è stata effettuata con spettrofotometro a λ 570 nm dopo 24, 48 e 72 ore dall'inizio del trattamento. L'esperimento è stato condotto in sestuplicato.

Soft Agar-assay

La capacità clonogenica delle cellule SW1736, 8505C, BCPAP e K1 è stata testata mediante il saggio di soft agar-assay dopo il silenziamento di HuR o il trattamento con CLMD-2 alla concentrazione di 35 μ M. Dopo 72 ore di silenziamento o di trattamento con CLMD-2 le cellule

sono state raccolte e risospese in 4 ml/piastra di mezzo RPMI completo contenente lo 0,25% di agarosio. Successivamente le cellule così risospese sono state piastrate ad una concentrazione di 10.000 cellule per piastra su di uno strato di agarosio all' 1% in piastre da 6 cm. Dopo 40 giorni, le colonie sono state contate utilizzando un microscopio invertito Leica DMI-600B (Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Retrotrascrizione

L'RNA totale è stato retrotrascritto nel DNA complementare (cDNA) usando random primers e 200 unità di SuperScript III Reverse Transcriptase in presenza di inibitori delle RNasi.

La SuperScript III RT utilizza l'RNA a singolo filamento, in presenza di un primer, per sintetizzare un DNA a singolo filamento complementare. 500 ng di RNA, portati al volume finale di 10.6 µl mediante aggiunta di H₂O sterile, sono stati addizionati con 0.4 µl di Random Hexaprimers (500 ng/µl) (Invitrogen) e 2 µl di mix di dNTPs 10 mM (Invitrogen). I campioni sono stati quindi denaturati a 70°C per 10 minuti e successivamente posti in ghiaccio.

Per ogni campione è stata allestita la seguente miscela di reazione:

4 µl di Buffer 5X (Tris 250 mM a pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM)

1 µl di DTT 0,1M

4 µl di dNTPs 200mM

1 µl di RNasi OUT 40U/µl

1 µl di SuperScript III RT 200U/µl

Dopo aver aggiunto ai campioni denaturati 7 µl della miscela di reazione sopra indicata essi sono stati mantenuti a temperatura ambiente per 5 minuti.

La retrotrascrizione è stata eseguita alla temperatura di 55°C per 60 minuti, 70°C per 15 minuti e 45°C per 5 minuti al termine dei quali i campioni sono stati portati al volume di 100 µl mediante aggiunta di 80 µl di H₂O sterile e posti in ghiaccio.

Real Time PCR

Il principio della Real-Time PCR si basa sulla rilevazione e quantificazione di un segnale fluorescente durante l'amplificazione PCR, in quanto la quantità di fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto di PCR.

In questo studio la metodica di Real Time PCR utilizzata è quella che prevede l'uso del Sybr Green, un colorante in grado di aumentare i livelli di emissione di fluorescenza quando si lega al solco minore del dsDNA (fluorescenza letta a 530 nm), utilizzando la *supermix* Platinum Sybr Green QPCR (Life Technologies) e il sistema ABI Prism 7300 Sequence Detection (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

L'analisi dell'espressione genica è stata eseguita con il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$, il quale assume che sia il gene target che il gene endogeno siano amplificati con la stessa efficienza, utilizzando l'SDS software (Applied Biosystems). Secondo il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ per ciascun campione i cicli (CT) del gene target vengono normalizzati con quelli del gene endogeno mediante la formula:

$\Delta C_t \text{ (test)} = C_t \text{ (gene target, test)} - C_t \text{ (gene endogeno, test)}$. I ΔC_t dei campioni vengono quindi a loro volta normalizzati con il ΔC_t del campione calibratore, un campione usato come riferimento per il confronto relativo dei risultati, mediante la formula: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ (test)} - \Delta C_t \text{ (calibratore)}$. Infine, il rapporto dell'espressione viene calcolato come $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Il risultato ottenuto è la variazione dell'espressione del gene target nel campione test rispetto al calibratore, normalizzati sull'espressione del gene endogeno. Normalizzando l'espressione del gene target a quello del gene endogeno si compensano le differenze nelle eventuali quantità dei campioni.

La reazione di PCR è stata effettuata in un volume finale di 12 μ l, utilizzando 2 μ l di cDNA come template. Le condizioni di PCR utilizzate sono le seguenti: incubazione a 50°C per 2 minuti, denaturazione a 95°C per 10 minuti e successivi 40 cicli di amplificazione composti da 15 secondi di denaturazione a 95°C, seguiti 1 minuto a 60°C per l'ibridazione/estensione. Ciascun campione è stato corso in triplicato e come normalizzatore dei livelli di RNA è stato usato il gene endogeno ACTB.

Le sonde oligonucleotidiche utilizzate in Real Time PCR sono state progettate utilizzando il software PrimerExpress (Applied Biosystems) ed acquistate da Sigma-Aldrich.

Scratch-assay

Le linee cellulari BCPAP, K1, SW1736 e 8505C sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti ad una concentrazione di 100.000 cellule/pozzetto. Il giorno successivo, il mezzo di coltura è stato sostituito con terreno aggiunto di DMSO, CMLD-2 35 μ M. Dopo 72 ore, il mezzo con il farmaco o il veicolo è stato sostituito con medium fresco ed è stato eseguito lo scratch con un puntale di micropipetta da 20 μ l. Le immagini dello scratch sono state scattate a 0, 6 e 24 ore mediante microscopio Nikon Eclipse Ti-S utilizzando il software NIS-Elements Software (Nikon). L'analisi dell'area dello scratch è stata effettuata attraverso il programma ImageJ attraverso il quale è stata determinata la fase esponenziale della velocità di migrazione.

RBP Immunoprecipitation (RIP)

L'immunoprecipitazione delle RNA binding protein (RIP) è un metodo utilizzato per identificare molecole di RNA associate a specifiche proteine. Nel nostro caso la RIP è stata utilizzata per valutare il profilo di legame dell'RBP HuR.

Per studiare il profilo di legame della proteina HuR nelle linee cellulari SW1736, 8505C, BCPAP e K1 abbiamo utilizzato il kit EZ-Magna RIP™ RNA-Binding Protein Immunoprecipitation (Millipore), seguendo le indicazioni del produttore.

Le cellule (2×10^7 per condizione) sono state staccate dalla piastra e lisate con 100 μ l di RIP lysis Buffer. 100 μ l di ogni lisato cellulare sono stati aggiunti a 50 μ l di biglie magnetiche precedentemente incubate con 5 μ g di anticorpo (RIPAb+ anti-HuR Millipore; o RIPAb+ anti-IgG Millipore come controllo negativo) a 4°C overnight. Dopo diversi lavaggi con RIP Wash Buffer, ciascun immunoprecipitato è stato incubato con 150 μ l di RIP proteinase K Buffer a 55°C per 30 minuti in shaking per permettere la digestione delle proteine. Le biglie magnetiche sono state quindi eliminate e i surnatanti risospesi in 250 μ l di RIP Wash Buffer per poi essere sottoposti a purificazione con aggiunta di fenolo e una soluzione di cloroformio:alcol isoamilico in proporzione 24:1. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 14000 rpm, sono stati prelevati 350 μ l di fase acquosa a cui è stato aggiunto un pari volume di cloroformio e centrifugati per 10 minuti a 14000 rpm. A 270 μ l di fase acquosa sono stati aggiunti 50 μ l di Salt solution I, 15 μ l di Salt Solution II, 5 μ l di Precipitate enhancer e 850 μ l di etanolo 100%. Dopo precipitazione dell'RNA a -80 overnight, il tutto è stato centrifugato a 14000 rpm per 30 minuti a 4°C e il pellet è stato lavato con etanolo 80% e dopo una seconda centrifugazione per 15 minuti a 14000 r.p.m a 4 °C il pellet è stato risospeso in 20 μ l di acqua sterile RNase-free.

Over-espressione di MAD2

Per l'over-espressione di MAD2 abbiamo acquistato il TrueClone MAD2 cDNA clonato in pCMV6-AC contenente l'intera open reading frame del gene umano di MAD2 (Origene, Rockville, MD, USA). 1 μ g di vettore è stato trasfettato utilizzando l'agente di trasfezione TurboFect (Fisher Scientific S.A.S., Illkirch, France) utilizzato ad una concentrazione di 2 μ l per

piastra. Un vettore vuoto pCMV è stato utilizzato come controllo negativo (NC). Una volta verificata l'avvenuta over-espressione mediante Western Blot, è stato svolto un esperimento di rescue per verificare il diretto coinvolgimento di MAD2 negli effetti indotti da CMLD-2. Le cellule sono state trasfettate con 0,1 µg di pCMV-MAD2 o con NC e trattate con CMLD-2 35 µM o con il solo veicolo (DMSO) per 72ore. La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT come precedentemente descritto.

Analisi Statistiche

Tutti i dati ottenuti in questo lavoro sono stati espressi come media \pm SD, e la significatività dei risultati è stata analizzata mediante test *t* di Student o one-way ANOVA eseguiti utilizzando il software GraphPAD (San Diego, CA, USA).

RISULTATI

Espressione di HuR in ATC

Per prima cosa sono stati valutati, mediante Western Blot, i livelli di espressione di HuR in una linea cellulare non tumorigenica (Nthy-ori-3.1) e in due linee cellulari derivate da ATC (SW1736 e 8505C).

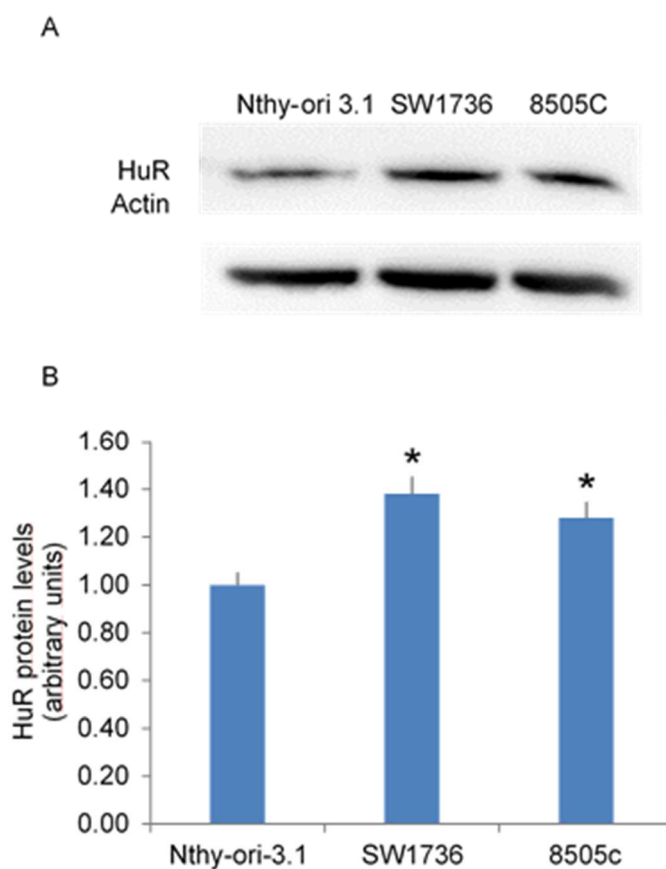


Figura 1. Espressione di HuR in linee cellulari di tiroide. Pannello A: Western Blot relativo all'espressione di HuR in linee cellulari di tiroide tumorali e non. Pannello B: quantificazione della proteina HuR dopo normalizzazione rispetto ai livelli di proteina β -actina. I risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, calcolato mediante one-way ANOVA.

Come si può notare dalla Figura 1, l'analisi di Wester Blot ha dimostrato come vi sia una significativa over-espressione di HuR nelle due linee cellulari di ATC rispetto alla linea cellulare non tumorigenica Nthy-ori-3.1, riconfermando quanto descritto da Baldan et al. nel precedente lavoro¹⁷⁹.

Effetti del silenziamento di HuR in linee cellulari di tumore anaplastico tiroideo

Una volta dimostrata l'over-espressione di HuR nelle cellule tumorali di tumore anaplastico tiroideo, e il suo possibile coinvolgimento nello sviluppo tumorale, in una seconda fase di questo studio siamo andati a valutare gli effetti biologici del silenziamento di HuR *in vitro*.

Il silenziamento di HuR

Il silenziamento genico di HuR è stato effettuato trattando le SW1736 e le 8505C per 72 ore con tre diversi siRNA diretti in modo specifico contro tre sequenze presenti nel trascritto di HuR (*siRNA1*, *siRNA2* e *siRNA3*) e con un oligonucleotide di controllo avente come target una sequenza non presente nel genoma umano (controllo negativo, CN). Il livello di silenziamento è stato valutato a livello proteico mediante Western Blot (Figura 4).

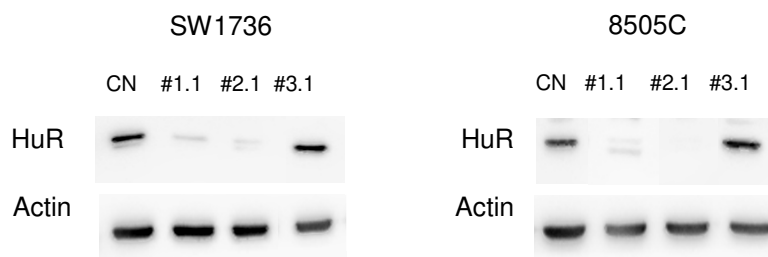
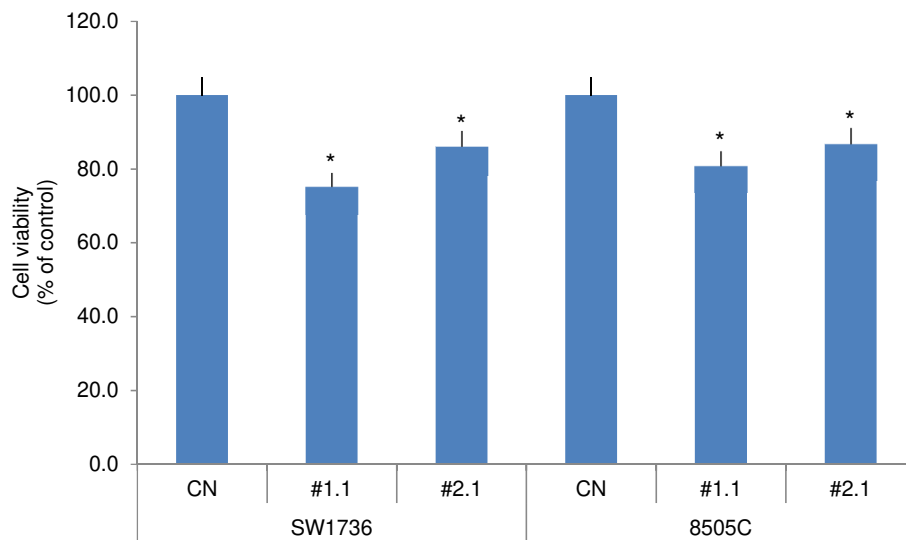


Figura 2. Valutazione, mediante Western Blot, dei livelli di HuR in seguito al silenziamento della proteina nelle due linee cellulari.

L'analisi di Western Blot ci ha permesso di determinare che il siRNA2 risulta essere quello più efficiente, in entrambe le linee, il siRNA1 ha un'efficacia leggermente minore mentre il siRNA 3 non sembra avere alcun effetto di silenziamento della proteina HuR (Figura 2). Poiché utilizzando quest'ultimo siRNA non si osserva alcuna diminuzione dell'espressione di HuR, è stato deciso di non utilizzare questo oligonucleotide per le analisi successive.

Effetti del silenziamento di HuR su vitalità cellulare ed apoptosi

Numerosi studi riportano come il silenziamento di HuR abbia effetti sulla vitalità cellulare e sui fenomeni apoptotici in numerose linee tumorali. Inoltre in un nostro precedente lavoro abbiamo già dimostrato come il silenziamento tramite siRNA di questa RBP sia in grado di ridurre la vitalità cellulare e di incrementare i livelli di apoptosi in una linea cellulare di tumore papillifero tiroideo¹⁷⁹. Sulla base di questi dati abbiamo quindi indagato gli effetti della down-regolazione di HuR indotta da siRNA su vitalità cellulare ed apoptosi nel nostro modello di tumore anaplastico tiroideo.

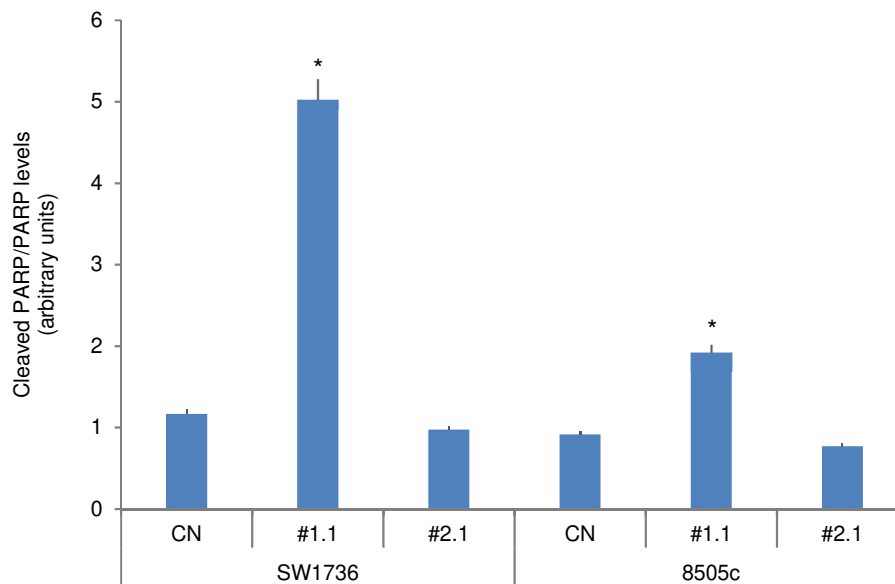


*Figura 3. Effetti del silenziamento di HuR sulla vitalità cellulare. Saggio MTT svolto su cellule SW1736 e 8505C entrambe trasfettate con i siRNA 1 e 2 alla concentrazione 1 nM per 72 ore. I risultati sono espressi in percentuale rispetto al controllo (CN). Ogni esperimento è stato effettuato in sestuplicato, i risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, calcolato mediante one-way ANOVA.*

Come raffigurato in figura 3, la trasfezione con siRNA specifici diretti contro HuR per 72 ore ad una concentrazione 1 nM determina una riduzione significativa della vitalità cellulare, testata mediante MTT assay, in entrambe le linee cellulari. In particolare, il siRNA 1 induce una riduzione della vitalità cellulare superiore al 20% in entrambe le linee, mentre il siRNA 2

ha un effetto lievemente minore attestandosi attorno al 15-20% rispetto al controllo negativo posto arbitrariamente a 100.

Allo scopo di valutare gli effetti del silenziamento di HuR sulla vitalità cellulare si associassero ad un incremento dei fenomeni apoptotici, è stata eseguita un'analisi, mediante Western Blot, per di quantificare i livelli proteici della frazione clivata di PARP la quale è noto essere direttamente correlata all'avanzamento del processo apoptotico.



*Figura 4. Effetti del silenziamento di HuR sull'apoptosi. Quantificazione dei livelli proteici della frazione clivata di PARP dopo normalizzazione rispetto ad actina in seguito ad analisi Western Blot su cellule SW1726 e 8505C trasfettate con siRNA 1 e 2 diretti contro HuR ad una concentrazione 1 nm per 72 ore. I risultati sono espressi ponendo a 1 il controllo negativo (CN). Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. I risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, calcolato mediante one-way ANOVA.*

Come mostrato in figura 4, dopo 72 ore di trasfezione, il siRNA 1 alla concentrazione 1 nm determina un forte incremento della frazione clivata di PARP (C-PARP) a testimoniare che gli effetti osservati sulla vitalità cellulare sono in gran parte ascrivibile ad una forte attivazione dei fenomeni apoptotici. Il siRNA 2 invece non determina alcun cambiamento significativo nei livelli di C-PARP, suggerendo che dietro alla diminuzione di vitalità indotta da questo siRNA, possano esserci altri fenomeni.

Effetti del silenziamento di HuR sull'aggressività tumorale

Numerosi studi hanno dimostrato come tra gli RNA messaggeri target di HuR siano compresi numerosi geni coinvolti nei processi che favoriscono l'aumento dell'aggressività tumorale e della capacità metastatica delle cellule maligne. Per questo motivo abbiamo voluto verificare gli effetti del silenziamento di HuR sull'aggressività cellulare nel nostro modello di tumore anaplastico tiroideo. A tal scopo abbiamo effettuato un soft agar assay, uno dei principali saggi utilizzati per indagare l'aggressività tumorale *in vitro*, dopo aver trasfettato le cellule SW1736 e 8505C con i due siRNA. Come si può evincere dalla figura 5, entrambi i siRNA, in entrambe le linee cellulari hanno determinato una riduzione significativa del numero di colonie rispetto al controllo negativo, posto arbitrariamente a 100.

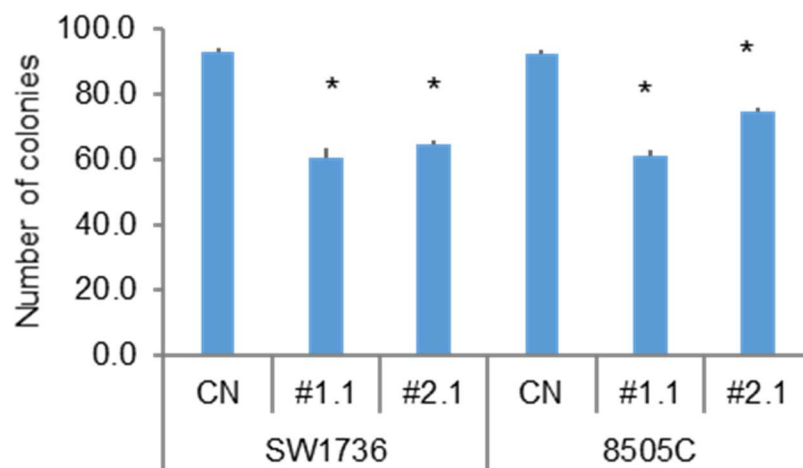


Figura 5. Effetti del silenziamento HuR sull'aggressività tumorale. Numero di colonie formate da cellule SW1736 e 8505C trasfettate con i siRNA 1 e 2 specifici per HuR (alla concentrazione 1 nM per 72 ore) contate dopo 40 giorni in soft agar. I valori sono espressi ponendo il controllo negativo (CN) pari a 100. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato, I risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, calcolato mediante one-way ANOVA.

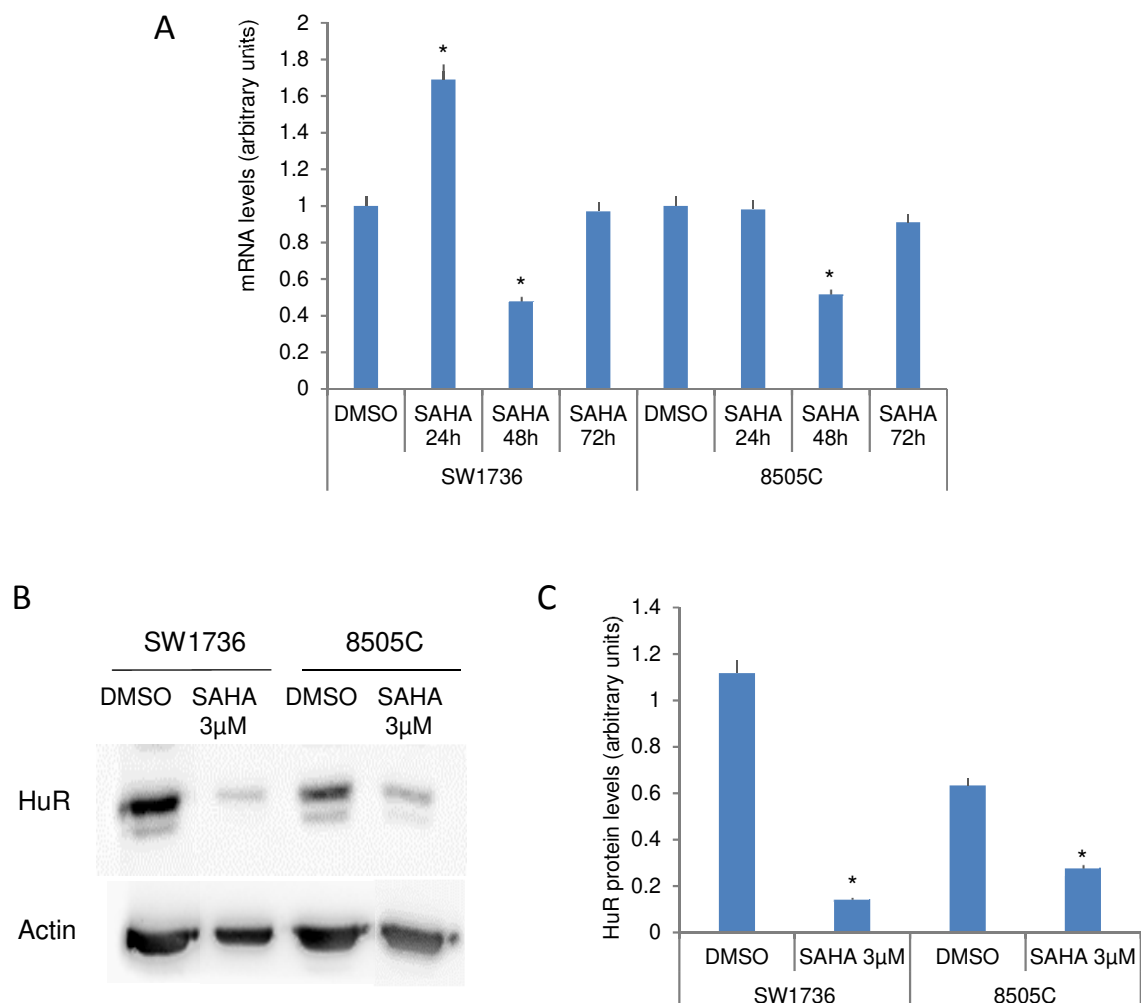
Ancora una volta, così come per vitalità ed apoptosi, il siRNA 1 dimostra effetti leggermente maggiori rispetto al siRNA 2. Questo risultato dimostra come HuR abbia un ruolo importante non soltanto nella vitalità e sopravvivenza cellulare ma anche nel mantenimento di un fenotipo aggressivo in linee cellulari di tumore anaplastico tiroideo.

Effetti dell'acido idrossissamico SAHA sull'espressione di HuR

Effetti del SAHA sull'espressione di HuR in cellule di tumore anaplastico tiroideo

Gli inibitori delle istone deacetilasi (HDAC) rappresentano un'importante classe di agenti anticancro, e tra questi uno dei più conosciuti e studiati è il SAHA, il quale è stato dimostrato essere in grado di indurre l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi in numerose linee cellulari tumorali¹⁸⁰. In un precedente studio avevamo già dimostrato come il SAHA fosse in grado di diminuire la vitalità cellulare in cellule SW1736¹⁸¹, inoltre Zhang et al hanno dimostrato come questa molecola riesca a down-regolare i livelli proteici di HuR in cellule murine¹⁸². Per questi motivi abbiamo indagato gli effetti del trattamento con questo inibitore delle deacetilasi istoniche sull'espressione di HuR in linee cellulari di tumore anaplastico tiroideo.

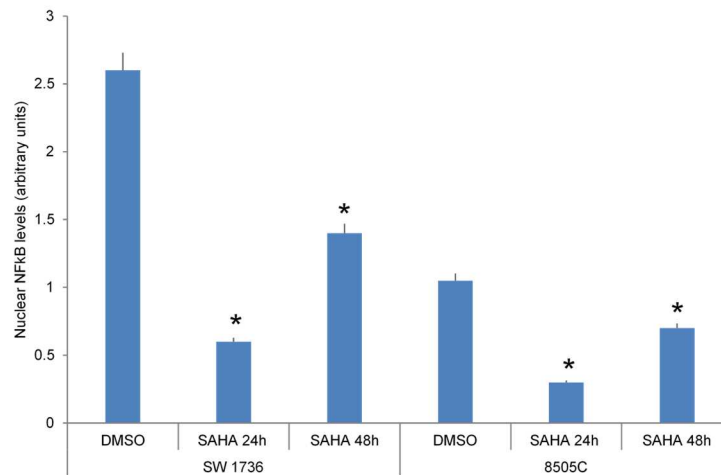
Abbiamo quindi trattato le cellule con SAHA alla concentrazione 3 μ M per differenti tempi di trattamento misurando i livelli di mRNA di HuR. Come mostrato nella Figura 6 (A) il trattamento con il SAHA 3 μ M determina una riduzione significativa dei livelli di mRNA di HuR in entrambe le linee dopo 48h di somministrazione. Viceversa, il trattamento con il SAHA per 24 ore induce un aumento di tali livelli nelle SW1736, mentre tempi più lunghi (72 ore) non sembrano modificare in alcun modo la quantità di trascritto. Una volta dimostrata la down-regolazione dell'mRNA di HuR in seguito a trattamento abbiamo indagato gli effetti del SAHA sui suoi livelli proteici. L'analisi del Western Blot, effettuata dopo trattamento con SAHA 3 μ M per 72 ore (B, C), dimostra una forte riduzione della quantità di proteina in entrambe le linee cellulari, in particolare nelle SW1736.



*Figura 6. Effetti del SAHA sull'espressione di HuR in cellule di tumore anaplastico tiroideo. (A) Quantificazione dei livelli di mRNA di HuR in seguito a trattamento con SAHA 3 μ M per 24, 48 o 72 ore dopo RT-real time PCR. I risultati sono espressi ponendo a 1 il controllo (DMSO). Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato, I risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ calcolato mediante one-way ANOVA. (B) Western Blot relativo all'espressione di HuR in seguito a trattamento con SAHA μ M e (C) quantificazione della proteina HuR dopo normalizzazione con la proteina β -actina. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato, I risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, calcolato mediante one-way ANOVA.*

Effetti del SAHA su NF- κ B in cellule di tumore anaplastico tiroideo

Kang et al hanno dimostrato come il fattore di trascrizione NF- κ B sia in grado di legare il promotore di HuR attivandone la trascrizione e promuovendo così la tumorigenesi⁹⁶. La forma inattiva di NF- κ B si localizza nel citoplasma dove si trova complessata con la proteina inibitrice I κ B α ; quando attivato invece, trasloca nel nucleo dove lega le sequenze target di DNA, attivando la trascrizione dei suoi geni bersaglio¹⁸³.



*Figura 7. Effetti del SAHA su NF- κ B in cellule di tumore anaplastico tiroideo. Quantificazione della proteina NF- κ B nucleare dopo normalizzazione con la proteina β -actina. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato, i risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, calcolato mediante one-way ANOVA.*

Allo scopo di indagare lo stato di attivazione di NF- κ B abbiamo svolto un'analisi mediante Western Blot delle frazioni nucleari di cellule SW1736 e 8505C, trattate o meno con il SAHA. I dati ottenuti (Figura 7) mostrano come il trattamento con il SAHA 3 μ M induca una riduzione significativa della frazione nucleare di NF- κ B, sia dopo 24 che dopo 48 ore, in entrambe le linee cellulari. Questi risultati dimostrano che la somministrazione di SAHA determina una riduzione dell'attivazione di NF- κ B in cellule di tumore anaplastico tiroideo.

Effetti dell'inibizione di HuR in linee cellulari di tumore tiroideo

I risultati ottenuti a seguito della down-regolazione di HuR mediante siRNA, evidenziano come questa RBP possa essere un valido bersaglio terapeutico per il tumore tiroideo anaplastico e come sia fondamentale l'individuazione di un inibitore farmacologico di HuR. Attualmente le uniche due modalità di inibizione di questa fondamentale RBP riportate in letteratura sono appunto mediante silenziamento indotto da siRNA o attraverso il trattamento con una piccola molecola: MS-444. Entrambi i metodi tuttavia presentano dei punti deboli, il primo è difficilmente applicabile *in vivo* a causa di limitazioni, come lo scarso up-take dei siRNA da parte delle cellule tumorali o la bassa stabilità di tali molecole nel siero; il secondo, sebbene offra maggiori vantaggi, inibisce l'omodimerizzazione di HuR modificandone la sub-localizzazione cellulare, ma tuttavia non agisce direttamente sul legame tra HuR e i siti ARE dei suoi mRNAs target.

Recentemente Wu et al. hanno messo a punto la sintesi di una piccola molecola chiamata CMLD-2 in grado di inibire HuR legandovisi competitivamente e bloccando di fatto l'interazione tra HuR e i suoi target in maniera diretta¹⁴³. Abbiamo quindi voluto testare gli effetti di questa molecola, che ad oggi rimane l'unico composto noto in letteratura in grado di inibire direttamente l'interazione HuR-mRNA, nel nostro modello cellulare considerando che in letteratura non sono presenti dati in merito.

Effetti di CMLD-2 sulla vitalità cellulare in linee cellulari di tumore tiroideo

Per prima cosa abbiamo valutato gli effetti di CMLD-2 a diverse concentrazioni e diversi tempi su quattro linee di tumore tiroideo, due derivate da tumore anaplastico tiroideo (SW1736 e 8505C) e due derivanti da tumore papillifero della tiroide (BCPAP e K1).

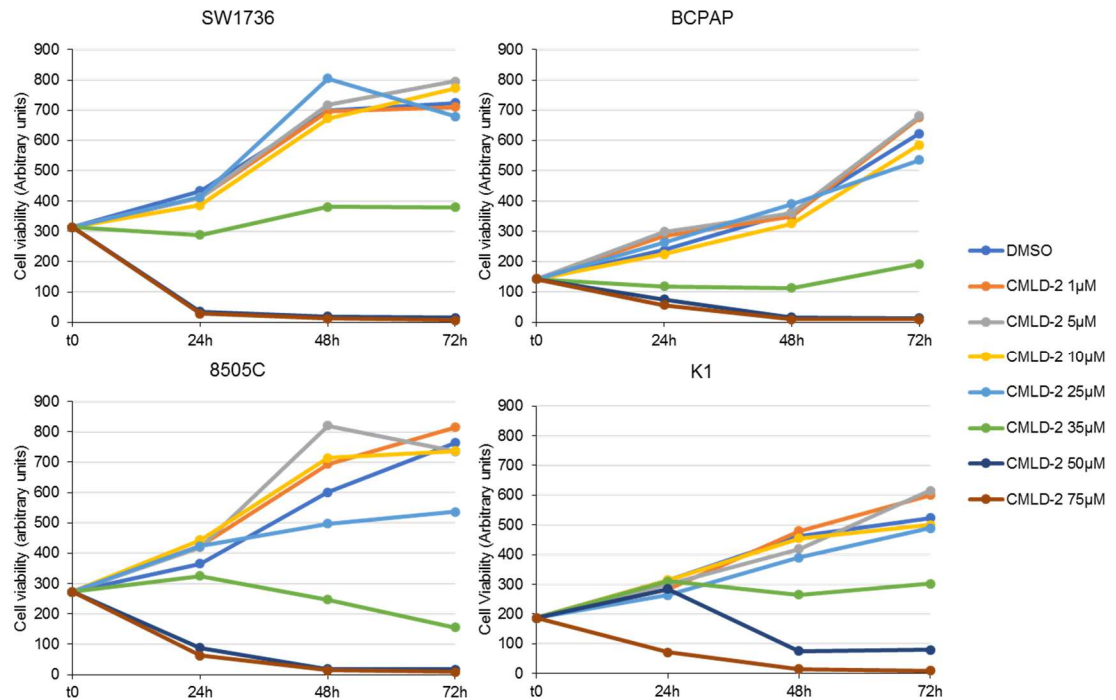
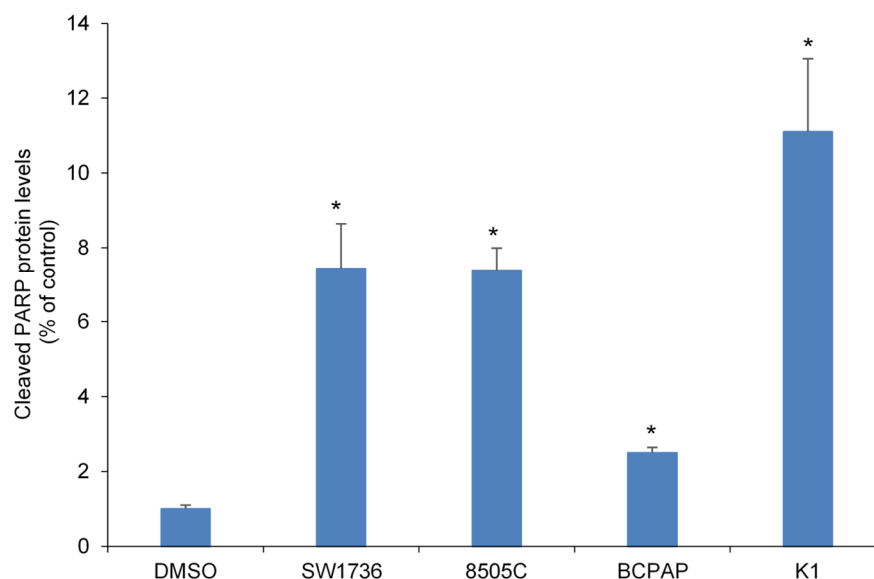


Figura 8. Effetti di CMLD-2 sulla vitalità cellulare. Valutazione della vitalità cellulare espressa in unità arbitrarie dopo MTT-assay svolto su cellule SW1736, 8505C, BCPAP e K1 dopo la somministrazione di CMLD-2 alle concentrazioni da 1 a 75 μ M o con il solo veicolo (DMSO) per 24, 48 o 72 ore. Ogni punto rappresenta la media di sei replicati, la deviazione standard è risultata inferiore al 10% per ciascun punto.

La Figura 8 riporta i risultati degli esperimenti di MTT svolti sulle quattro linee cellulari dopo il trattamento per 24, 48 e 72 ore con CMLD-2 o solo veicolo, in questo caso DMSO, alle concentrazioni da 1 μ M a 75 μ M. CMLD-2 si è dimostrato efficace nell'indurre una diminuzione della vitalità cellulare in tutte le linee esaminate alle concentrazioni di 35, 50 e 75 μ M, con i primi effetti visibili già a 24 ore e molto più netti a 48 e 72 ore (pValue <0.05 in tutte le linee cellulari). Sulla base di questi risultati abbiamo scelto come dose efficace quella 35 μ M e come durata di trattamento le 72 ore; questi parametri di somministrazione di CMLD-2 sono stati quindi utilizzati per tutti i successivi esperimenti.

Effetti di CMLD-2 sull'apoptosi in cellule di tumore tiroideo

Allo scopo di valutare se la forte riduzione della vitalità cellulare osservata dopo il trattamento con CMLD-2 fosse dovuta all'attivazione di fenomeni di morte cellulare riconducibili al processo apoptotico, abbiamo voluto testare i livelli della frazione clivata di PARP dopo la somministrazione dell'inibitore di HuR.



*Figura 9. Effetti di CMLD-2 sull'apoptosi. Analisi densitometrica dei livelli di PARP clivata ottenuta mediante Western Blot svolto su cellule di tumore tiroideo trattate con CMLD-2 35 μ M per 72 ore o con il solo DMSO. Per ciascuna linea cellulare i risultati sono stati normalizzati su actina ed espressi ponendo ad 1 il rispettivo controllo (DMSO). Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato, i risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, calcolato mediante one-way ANOVA.*

Il trattamento con CMLD-2 35 μ M per 72 ore, induce un forte e significativo aumento del taglio proteolitico di PARP (Figura 9), in particolare nelle K1 si osservano i maggiori effetti con un incremento di circa 11 volte, effetti ben evidenti anche nelle cellule di ATC (SW1736 e 8505C), che mostrano aumenti della frazione clivata di PARP di circa 7 volte. Gli effetti minori si registrano sulle BCPAP, dove comunque si nota un aumento di 2,5 volte rispetto al controllo, a dimostrare comunque l'attivazione dei processi apoptici dopo trattamento con CMLD-2.

Effetti di CMLD-2 sull'aggressività tumorale

Una volta dimostrato come CMLD-2 sia in grado di indurre una forte riduzione della vitalità cellulare, determinando anche un netto aumento della morte cellulare per apoptosi, abbiamo voluto studiare gli effetti di questo inibitore di HuR sull'aggressività tumorale nelle quattro linee di tumore anaplastico tiroideo prese in esame. A tale scopo abbiamo valutato la capacità di migrazione delle cellule che rappresenta una caratteristica tipica di cellule tumorali aggressive e la quale consente loro di colonizzare altri tessuti attraverso il processo di metastatizzazione, e la capacità di formare colonie in condizioni di crescita ancoraggio-indipendenti mediante un soft-agar assay, un metodo di indagine circa l'aggressività tumorale ampiamente utilizzato e riconosciuto.

Per quanto riguarda la capacità di migrare, essa è stata testata eseguendo uno scratch-assay dopo aver trattato le cellule con CMLD-2 per 72 ore. La figura 10 mostra le fotografie ottenute al microscopio dopo 24 ore dalla generazione della "ferita" in cellule trattate con CMLD-2 o con il solo veicolo (DMSO) (A) e l'istogramma rappresentante la quantificazione della capacità migratoria delle cellule (B). Come si può osservare, il trattamento con CMLD-2, induce una forte riduzione della capacità migratoria direzionale in tutte le quattro linee cellulari di tumore tiroideo, in particolare tale riduzione risulta essere del 20% nelle SW1736, più del 50% in cellule 8505C e BCPAP e più dell'80% nelle K1.

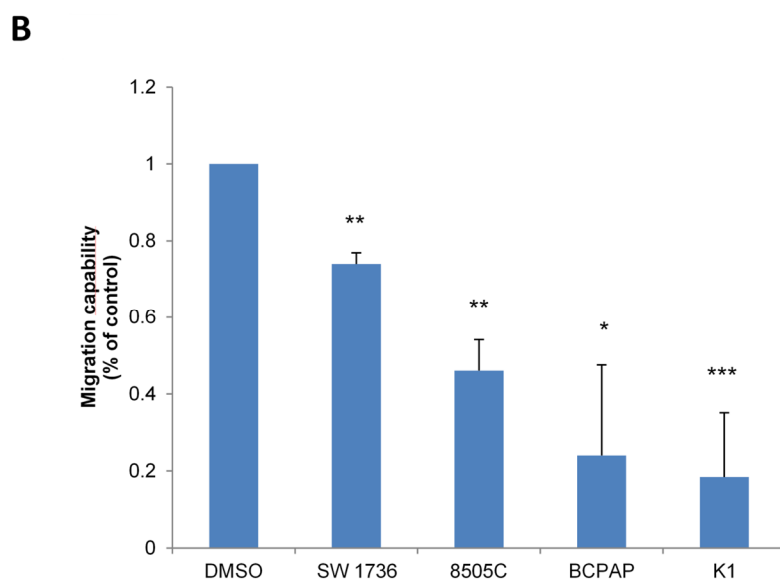
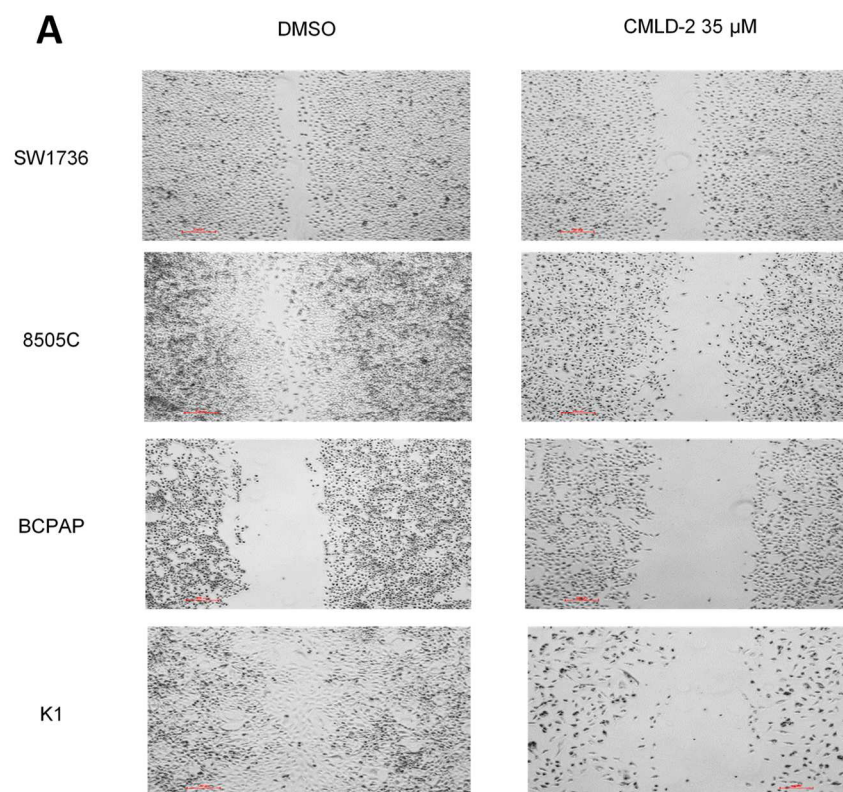
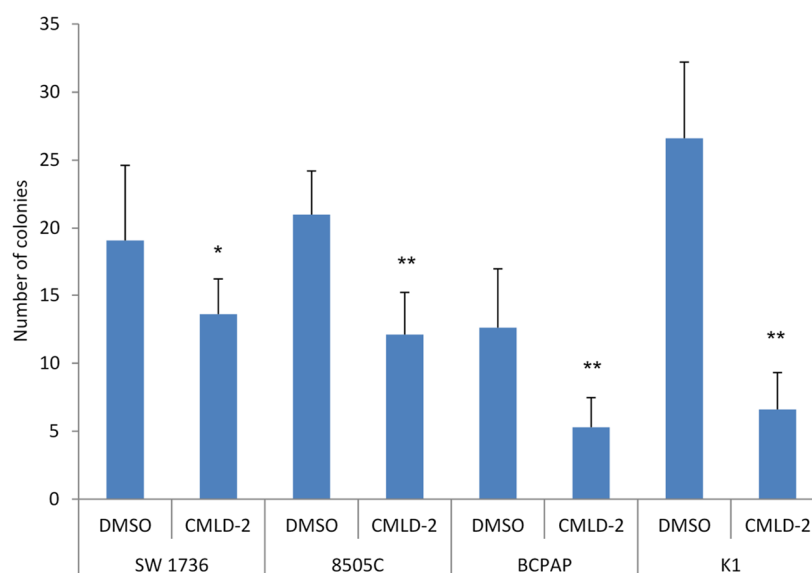


Figura 10. Effetti di CMLD-2 sulla migrazione cellulare. A: Fotografie ottenute al microscopio ottico di cellule SW1736, 8505C, BCPAP e K1 trattate con CMLD-2 35 μ M per 72 ore o con il solo DMSO dopo 24 ore dalla generazione della "ferita". B: istogramma rappresentante la quantificazione della capacità migratoria delle cellule. I valori sono rappresentati come percentuale rispetto al controllo (DMSO). Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato, I risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ calcolato mediante one-way ANOVA

Dopo aver testato la capacità di migrazione in risposta al trattamento abbiamo valutato come variasse l'aggressività tumorale in seguito a somministrazione di CMLD-2 svolgendo un soft agar assay. Le cellule sono state trattate con CMLD-2 35 μ M per 72 ore, al termine del trattamento sono state contate e piastrate in egual numero in soft agar. Dopo 40 giorni, sono state contate le colonie che si erano formate a partire da cellule trattate con l'inibitore di HuR o con il semplice veicolo (DMSO). Come si può osservare nella figura 11, l'inibizione di HuR determina la riduzione del numero di colonie in tutte le linee cellulari di tumore tiroideo.



*Figura 11. Effetti di CMLD-2 su aggressività tumorale. L'istogramma rappresenta il numero di colonie formatesi in soft-agar dopo 40 giorni per ogni linea cellulare di tumore tiroideo. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato, I risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, calcolato mediante one-way ANOVA*

L'inibizione di HuR attraverso CMLD-2, dunque, oltre a determinare una diminuzione della vitalità e della sopravvivenza cellulare, è anche in grado di ridurre l'aggressività tumorale come evidenziato dai risultati ottenuti su capacità di migrazione e numero di colonie in soft agar.

Effetti molecolari dell'inibizione di HuR

Effetti di CMLD-2 sull'espressione di MAD2

Al fine di comprendere meglio i meccanismi molecolari alla base degli effetti biologici dell'inibizione di HuR mediante CMLD-2 in linee cellulari di tumore tiroideo, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su geni i cui mRNA fossero target di HuR. Basandoci sui risultati pubblicati da Lebedeva et al. abbiamo ristretto il campo di indagine a 20 geni i cui mRNA fossero target di HuR e i cui livelli di espressione fossero fortemente ridotti in seguito al silenziamento di HuR. Nella tabella sono riportati i primi 20 geni ordinati in base alla più alta riduzione dei livelli di proteina dopo silenziamento di HuR, ciò sta a significare che per l'espressione di questi geni questa RBP gioca un ruolo fondamentale.

Tabella 1. Variazione dei livelli di mRNA e proteina di geni target di HuR in seguito al suo silenziamento. La variazione è stata calcolata come logaritmo in base 2 del rapporto tra silenziato e controllo. Lebedeva et al.⁹⁰

	Log2 fold-changes HuR KD vs. Mock	
GENE	mRNA	PROTEINA
ELAVL1	-1,36	-3,78
GDI2	0,25	-3,52
FMR1	-0,87	-1,37
YWHAH	-1,42	-1,34
NFYC	0,13	-1,28
MPV17	-1,02	-1,26
COPS7B	-0,86	-1,25
TXNDC15	-0,73	-1,19
EIF4A2	-0,60	-1,18
IL6ST	-0,56	-1,16

FECH	-0,30	-1,15
C5orf24	-0,60	-1,13
HNRNPR	-0,90	-1,07
BCAT1	-0,41	-1,07
FKBP1A	-1,45	-1,03
QSOX2	-0,41	-1,03
HP1BP3	-0,55	-0,97
SLC7A11	-0,47	-0,95
MAD2L1	-0,86	-0,94
GCLC	-0,56	-0,92

All'interno di questo selezionato gruppo di geni abbiamo posto la nostra attenzione su alcuni di essi, selezionati in base a parametri quali: dati in letteratura, coinvolgimento nel cancro, espressione in tumore tiroideo etc., andandone a verificare l'eventuale cambiamento di espressione in seguito a trattamento con CMLD-2. Questo procedimento ci ha così permesso di individuare MAD2 come gene di interesse in quanto correlato con vari tipi di cancro e over-espresso in tumori tiroidei¹⁸⁴.

Per prima cosa abbiamo confermato che l'mRNA di MAD2 risultasse un target specifico di HuR anche nel nostro modello cellulare. A tale scopo abbiamo immunoprecipitato i complessi HuR-mRNA target tramite una RIP. Una volta purificato l'RNA immunoprecipitato, abbiamo quantificato l'arricchimento di MAD2 presente nei campioni con anticorpo anti-HuR rispetto a quello presente nel campione trattato con IgG generiche. Come è possibile notare nella figura 12, MAD2 risulta arricchito in tutte le quattro linee cellulari, in particolare nelle 8505C e nelle BCPAP, sia rispetto alle IgG sia rispetto a MARCH3 noto per non essere un target di

HuR e qui utilizzato come controllo negativo. Ciò conferma come MAD2 risulti un target di HuR anche nelle linee cellulari di tumore tiroideo.

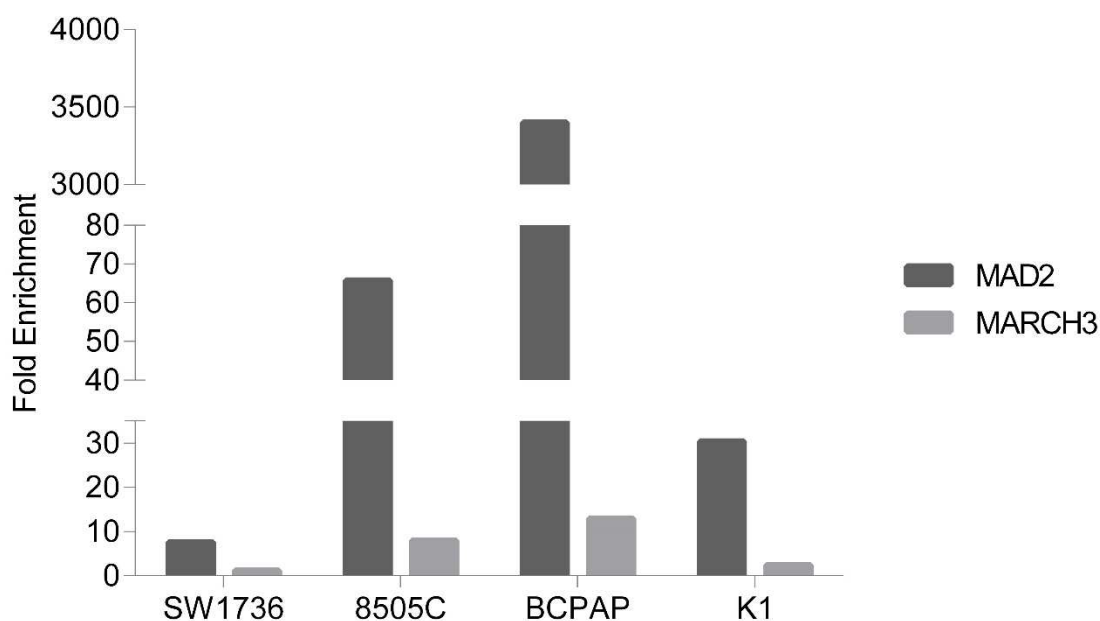


Figura 12. Le cellule sono state lisate ed immunoprecipitate mediante anticorpo anti-HuR o anti-IgG. Gli mRNA legati ad HuR di MAD2 o MARCH3 (controllo negativo) sono stati retrotrascritti ed amplificati con primers specifici per i due geni ed analizzati mediante qPCR. L'immunoprecipitato mediante IgG è stato posto arbitrariamente ad 1 e i risultati sono espressi come fold enrichment rispetto ad esso. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato.

Per verificare la nostra ipotesi secondo la quale l'inibizione di HuR mediata da CMLD-2 impedirebbe il legame della RBP con l'mRNA di MAD2, influenzandone i livelli di espressione, abbiamo analizzato, mediante Western Blot, i livelli proteici di MAD2 dopo aver trattato le cellule con CMLD-2 35 μ M per 72 ore.

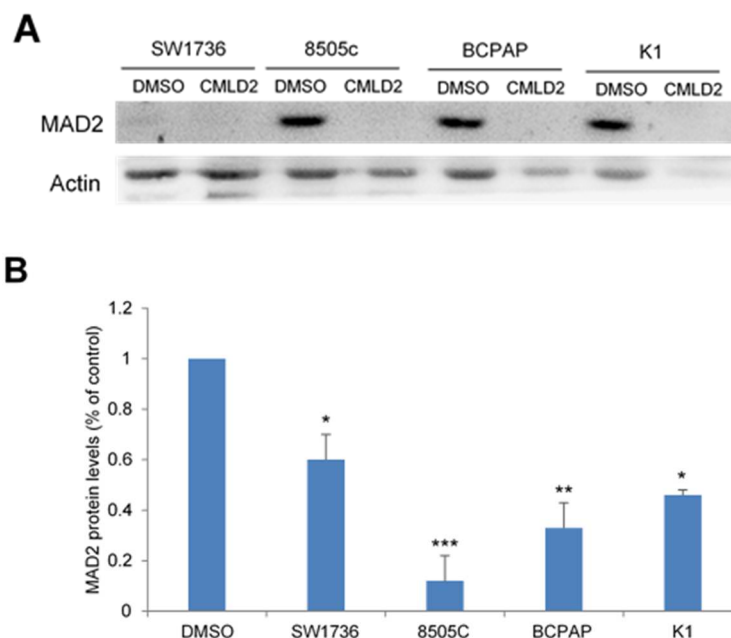


Figura 13. A) Western Blot relativo all'espressione di MAD2 in seguito a trattamento con CMLD-2 35 μ M per 72 ore e (B) quantificazione della proteina MAD2 dopo normalizzazione con la proteina β -actina. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. I valori sono stati calcolati ponendo arbitrariamente ad 1 il controllo (DMSO). I risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ calcolato mediante one-way ANOVA.

Coerentemente con la nostra ipotesi, la somministrazione di CMLD-2 induce una netta e significativa riduzione delle quantità di proteina in tutte le quattro linee di tumore tiroideo (Figura 13) ed in particolare tali effetti sono maggiormente evidenti in 8505C e BCPAP. Alla luce di questi risultati abbiamo selezionato queste due linee cellulari per i successivi esperimenti, proprio perché mostrano gli effetti più importanti per quanto riguarda la down-regolazione di MAD2 in seguito ad inibizione di HuR.

Effetti del silenziamento di MAD2 sulla vitalità cellulare

Avendo dimostrato che il trattamento con CMLD-2 determina una riduzione dell'espressione di MAD2, abbiamo valutato se gli effetti sulla vitalità cellulare indotti dall'inibizione di HuR fossero, almeno in parte, dovute proprio alla down-regolazione di MAD2. Per questo motivo è stato effettuato un esperimento di silenziamento genico di MAD2 utilizzando 3 diversi siRNA

diretti specificatamente contro sequenze presenti in tale gene, alla concentrazione 5n, i quali come si può notare nella Figura 14 (A), inducono una forte riduzione dell'espressione dei livelli proteici di MAD2 in entrambe le linee dopo 72 ore.

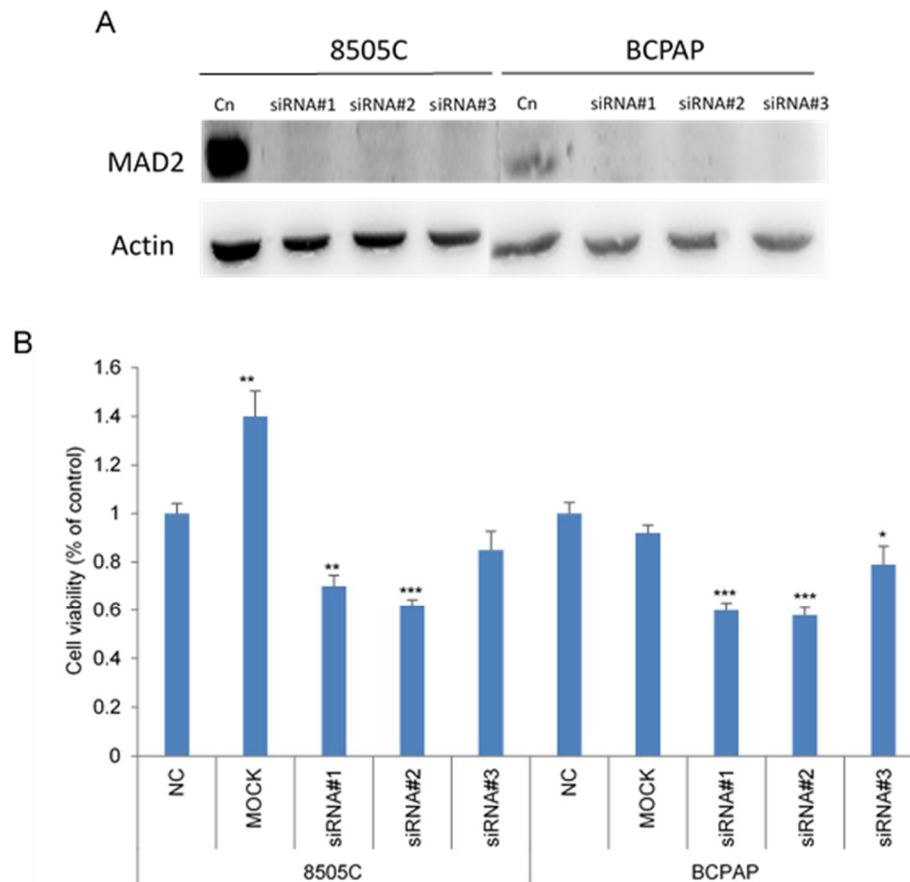


Figura 14. Effetti del silenziamento di MAD2. (A) Le cellule 8505C e BCPAP sono state trasfettate con un controllo negativo (CN) o con tre differenti siRNA (siRNA#1, #2, #3) aventi sequenze specifiche per MAD2. Dopo 72 ore, i livelli di espressione proteica di MAD2 sono stati valutati mediante Western Blot, verificando l'avvenuto silenziamento. (B) Le cellule 8505C e BCPAP sono state trasfettate con il solo veicolo (mock), con un controllo negativo (NC) o con tre differenti siRNA (siRNA#1, #2, #3) aventi sequenze specifiche per MAD2 per 72 ore dopodiché è stato svolto un MTT-assay per valutare la vitalità cellulare. I valori sono espressi in percentuale rispetto al controllo negativo (NC). Ogni esperimento è stato effettuato in sestuplicato, i risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ calcolato mediante one-way ANOVA.

Una volta verificato l'avvenuto silenziamento abbiamo svolto un MTT-assay su cellule 8505C e BCPAP trasfettate con i siRNA diretti contro MAD2 testandone la vitalità in risposta alla down-regolazione di MAD2. Abbiamo così dimostrato come il silenziamento di MAD2 induca

una diminuzione significativa della vitalità cellulare di circa il 40% in entrambe le linee quando effettuato con i siRNA 1 e 2, il siRNA 3 invece sembra avere effetti minori (Figura 14 B).

Effetti del trattamento con CMLD-2 su cellule di tumore tiroideo over-esprimenti MAD2

Al fine di confermare l'ipotesi secondo la quale MAD2 sarebbe direttamente coinvolto negli effetti indotti da CMLD-2 sulle cellule di tumore tiroideo, abbiamo svolto un esperimento di rescue. A tale scopo le cellule 8505C e BCPAP sono state trasfettate con un plasmide contenente il cDNA di MAD2 (pCMV6-MAD2) o con plasmide vuoto (pCMV6-empty) come controllo negativo. Abbiamo così ottenuto cellule in grado di over-esprimere MAD2, le quali sono state trattate con CMLD-2 35 μ M per 72 ore. Come mostrato nella Figura 15 (A), l'over-espressione di MAD2 determina un parziale recupero dei livelli proteici di MAD2 precedentemente abbattuti tramite trattamento con CMLD-2.

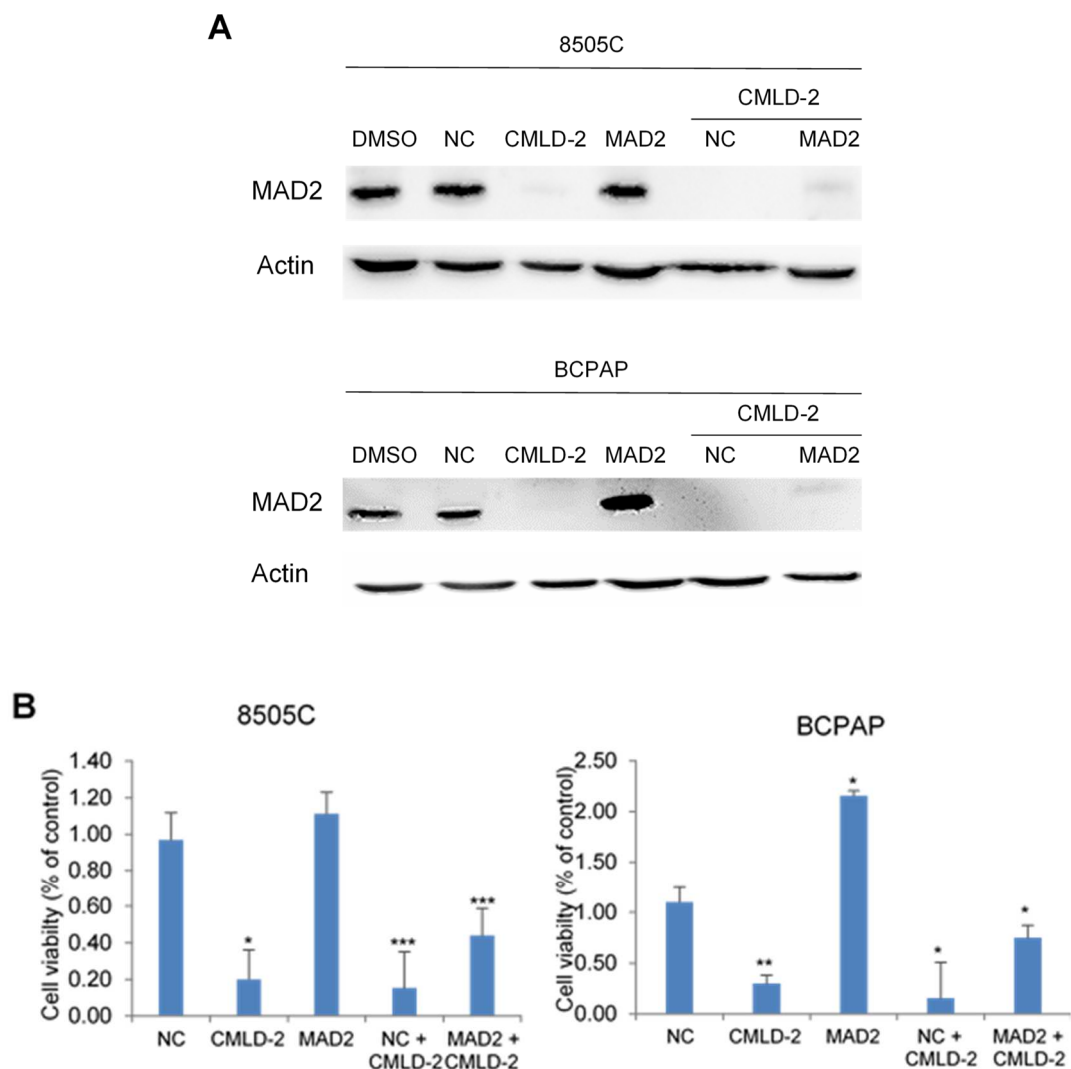


Figura 15. Effetti del trattamento di CMLD-2 su cellule overesprimenti MAD2. (A) Le cellule 8505C e BCPAP sono state trasfettate con un plasmide vuoto (NC) o con un plasmide contenente cDNA di MAD2 (MAD2). Le cellule sono state quindi trattate con CMLD-2 35 μ M e dopo 72 ore è stato svolto un Western Blot per valutare i livelli di espressione proteica di MAD2. (B) Le cellule 8505C e BCPAP sono state trattate con DMSO, CMLD-2 35 μ M, pCMV6-empty (NC) o pCMV6-MAD2 (MAD2) da soli o in combinazione. Dopo 72 ore, è stata testata la vitalità cellulare mediante MTT-assay. I valori sono espressi come percentuale del controllo negativo (NC). Ogni esperimento è stato effettuato in sestuplicato, i risultati vengono rappresentati come media \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ calcolato mediante one-way ANOVA.

Abbiamo infine voluto verificare che questa parziale re-espressione di MAD2 fosse accompagnata anche da un recupero in termini di vitalità cellulare. Per questo motivo abbiamo svolto un MTT-assay su cellule 8505C e BCPAP trattate con il solo veicolo (DMSO) o con CMLD-2 35 μ M per 72 ore ed over-esprimenti (MAD2) o meno (NC) MAD2. Come

riportato nella Figura 15 (B), le cellule 8505C e BCPAP over-esprimenti MAD2 hanno mostrato una diminuzione significativa degli effetti di CMLD-2 sulla vitalità cellulare, circa il 30% in entrambe le linee. Ciò conferma che una parte degli effetti di CMLD-2 in cellule di tumore tiroideo sono direttamente legati all'alterazione dell'espressione di MAD2.

DISCUSSIONE

La regolazione dell'espressione genica rappresenta un processo fondamentale mediante il quale le cellule sono in grado di rispondere ai cambiamenti e agli stimoli prodotti dal microambiente nel quale si trovano, tale processo è finemente controllato da numerosi check-points, posti sia prima che dopo la trascrizione da DNA a RNA.

La regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica rappresenta uno dei principali meccanismi utilizzati dalle cellule per modulare tale processo; essa è in grado di generare numerosi prodotti proteici differenti partendo da un singolo gene trascritto mediante fenomeni come splicing alternativo, poliadenilazione su siti alternativi ed editing dell'RNA, modificazioni, queste, che avvengono a livello nucleare. Nel citoplasma invece, l'utilizzo di siti diversi di inizio della traduzione porta alla sintesi di proteine funzionalmente diverse partendo da uno stesso RNA messaggero¹⁸⁵.

Sempre a livello citoplasmatico, l'espressione genica può essere strettamente controllata attraverso la regolazione della stabilità della molecola di mRNA e dei suoi livelli di traduzione mediante l'interazione del messaggero con molecole quali siRNA o microRNA (fenomeno di RNA interference) o mediante l'azione delle RNA binding proteins (RBPs)¹⁸⁶. Negli ultimi anni questi fenomeni di controllo dell'espressione genica hanno assunto una sempre maggior importanza. Schwanhäusser et al hanno analizzato contemporaneamente i livelli degli mRNA e dei loro rispettivi prodotti proteici, dimostrando come gran parte delle proteine sintetizzate dalla cellula vengono regolate proprio a livello traduzionale.¹⁸⁷

Le RNA binding protein sono una classe di proteine che interagiscono con specifici elementi *cis* presenti nelle sequenze degli mRNA attraverso il riconoscimento di motivi costituiti da sequenze lineari o attraverso la formazione di strutture secondaria dinamiche. Generalmente il legame con elementi *cis* posti al 5' non tradotto (UTR) del messaggero ne controlla l'inizio

della traduzione, mentre quello al 3'UTR ha effetto sulla stabilità dell'mRNA e sull'efficienza di traduzione¹⁸⁸.

Durante, o immediatamente dopo, la trascrizione le RBPs legano spontaneamente i loro mRNA target al fine di facilitare il processamento del pre-mRNA, dopodiché esse richiamano altre RBPs formando così dei complessi detti ribonucleoproteici (RNPs) che circondano l'mRNA target. Questi complessi sono in grado di determinare il tipo di splicing e la sub-localizzazione cellulare dell'mRNA, oltre che la successiva traduzione piuttosto che la sua degradazione¹⁸⁹.

Una volta appurato il ruolo fondamentale delle RBP nel controllare la risposta cellulare mediante la regolazione dell'espressione genica, appare evidente come una qualsiasi mutazione o alterazione che ne modifichi l'espressione o l'attività, o che modifichi il loro pattern di mRNA target, siano alla base dello sviluppo di numerose patologie, prima tra tutte il cancro¹⁹⁰.

HuR è la sola RNA binding protein della famiglia delle *human embryonic lethal abnormal vision* (ELAV) ad essere ubiquitariamente espressa e ad essere coinvolta nella regolazione della stabilità e della traduzione dell'mRNA. Numerosi studi hanno dimostrato un suo ruolo cruciale in vari tipi di tumore umano come l'adenocarcinoma del polmone, il cancro dell'ovaio, il tumore a cellule squamose della laringe e il tumore del colon¹⁰⁶. Il suo coinvolgimento nelle neoplasie deriva dal fatto che HuR agisce spesso come un promotore della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, inoltre tra gli mRNA di cui favorisce l'espressione, si ritrovano oncogeni e geni anti-apoptotici o coinvolti nell'invasività tumorale e nell'angiogenesi¹⁹¹.

Partendo da questi dati riguardanti l'importanza della deregolazione di HuR in numerosi tipi di cancro, in un precedente lavoro abbiamo dimostrato la sua over-espressione nel tumore papillifero tiroideo. Inoltre abbiamo potuto verificare come i profili di legame tra HuR e i suoi mRNA target siano diversi tra linee cellulari tiroidee normali e tumorali, e come la sua

espressione sia necessaria per la sopravvivenza e la proliferazione cellulare in questo tipo di tumore¹⁷⁹.

Il carcinoma tiroideo rappresenta la neoplasia di tipo endocrino più diffusa, sebbene costituisca non più del 2% di tutti i tumori umani¹⁴⁸. La classificazione delle diverse tipologie di carcinoma tiroideo avviene basandosi sul tipo cellulare dal quale origina la neoplasia. Generalmente il tumore tiroideo non si manifesta con una evidente sintomatologia, ciò ne rende complicata una precoce diagnosi, la quale ben più frequentemente viene effettuata a seguito di analisi svolte per altre patologie. Anche a causa di una diagnosi solitamente tardiva, l'unica terapia disponibile consiste nell'asportazione della ghiandola tiroidea seguita da un ciclo di radioterapia e terapia di soppressione ormonale. Negli ultimi anni sono stati fatti numerosi passi avanti nell'identificazione e nella definizione delle caratteristiche biologiche di questo tipo di tumori, grazie all'individuazione di numerose alterazioni geniche comprendenti mutazioni e riarrangiamenti a livello cromosomico. Come per numerosi altri tipi di cancro, anche nella ricerca riguardante il tumore tiroideo, la scoperta e la messa a punto di marker molecolari, siano essi diagnostici o terapeutici, rappresenta un campo fondamentale d'indagine.

Mentre i tumori tiroidei differenziati (papilliferi o follicolari) sono ritenuti facilmente trattabili e curabili, i tumori tiroidei indifferenziati, midollari e anaplastici, seppur meno frequenti, sono molto più aggressivi ed in grado di metastatizzare precocemente, caratteristiche che rendono la loro prognosi nettamente sfavorevole¹⁹². Tra quest'ultimi, il tumore anaplastico tiroideo (ATC), rappresenta una delle più aggressive neoplasie umane, con un tasso di sopravvivenza ad 1 anno dalla diagnosi inferiore al 20%¹⁹³. Trattandosi di un tumore molto raro e con un tasso di sopravvivenza così basso, risulta molto difficile ottenere dati certi circa gli eventuali effetti positivi delle diverse strategie terapeutiche, fino ad oggi infatti non è stato stabilito

nessun trattamento unificato in grado di indurre un aumento delle probabilità di sopravvivenza¹⁹⁴.

Il progetto portato avanti durante il mio dottorato ha avuto, quindi, come obiettivo, lo studio degli effetti della down-regolazione di HuR e della sua inibizione come possibile approccio terapeutico per il trattamento del tumore tiroideo, in particolar modo nel caso del tumore anaplastico tiroideo, per il quale non è stata ancora messa a punto una strategia terapeutica in grado di determinare effetti concreti in termini di sopravvivenza dei pazienti.

Il punto di partenza di questa tesi è dato dai risultati ottenuti in un precedente lavoro in cui abbiamo dimostrato come HuR sia over-espresso nei tessuti di tumori tiroidei mediante un'analisi immunoistochimica su campioni tumorali e normali. Da questa prima analisi è emerso anche come HuR sia principalmente localizzato a livello nucleare, e che nei tumori più aggressivi come gli anaplastici, vi sia un forte incremento della frazione citoplasmatica.

Una volta dimostrata l'over-espressione di HuR nelle linee cellulari di tumore anaplastico tiroideo, siamo passati a studiarne la possibile implicazione nello sviluppo di questo tipo di neoplasia, nel suo sostenimento e nella aggressività tumorale. Per studiare ciò abbiamo intrapreso la strada del silenziamento genico dell'espressione di *HuR in vitro*.

Poiché numerosi dati presenti in letteratura hanno dimostrato come HuR risulti determinante nel mantenere alti i livelli di vitalità cellulare nonché la sua interazione con RNA messaggeri di geni coinvolti nell'evasione dall'apoptosi, abbiamo per prima cosa verificato che il silenziamento di HuR mediante siRNA determina una riduzione significativa della vitalità cellulare ed un aumento dei fenomeni apoptotici in cellule SW1736 e 8505C.

Tuttavia, gli effetti su vitalità e apoptosi spesso risultano non sufficienti, in quanto le cellule meno vitali o sopravvissute possono evadere dal sito tumorale principale per metastatizzare in altri tessuti, laddove siano presenti microambienti maggiormente favorevoli. Abbiamo quindi voluto valutare se il silenziamento di HuR inducesse anche una riduzione

dell'aggressività. Attraverso un soft agar assay è stata dimostrata una netta diminuzione del numero di colonie. Tale risultato chiarisce come HuR si candidi come target specifico di terapia, in quanto coinvolta non solo in fenomeni proliferativi ma anche in meccanismi riguardanti l'aggressività tumorale e la capacità metastatica.

A questo punto siamo passati alla ricerca di farmaci o molecole che potessero inibire l'espressione di HuR, focalizzandoci in particolare sull'acido idrossamico SAHA, un inibitore delle deacetilasi istoniche già approvato dall'FDA per il trattamento di altre neoplasie¹⁹⁵. Tale scelta è stata fatta alla luce dei risultati di Zhang e colleghi, i quali avevano precedentemente dimostrato come il trattamento con il SAHA fosse in grado di ridurre l'espressione di HuR in un modello murino¹⁸².

Anche nel nostro modello di tumore anaplastico tiroideo tale farmaco si è dimostrato in grado di ridurre prima i livelli di mRNA di HuR (dopo 48 ore di trattamento) e successivamente anche la quantità di proteina espressa (dopo 72 ore di trattamento).

Al fine di comprendere meglio i meccanismi molecolari alla base di tali effetti, ci siamo concentrati sull'attività di NF- κ B, fattore di trascrizione che rappresenta il principale regolatore dell'espressione di HuR⁹⁶. Il trattamento con il SAHA è risultato essere in grado di inibire l'azione di NF- κ B, suggerendo così che la sua azione sui livelli di espressione di HuR possa passare proprio da tale fattore di trascrizione che una volta inibito non è più in grado di sostenere alti livelli di produzione di mRNA di HuR.

Con questi risultati abbiamo dimostrato per la prima volta come l'RBP HuR giochi un ruolo fondamentale nella tumorigenesi del tumore anaplastico tiroideo, e come essa sia coinvolta nei meccanismi con il quale il SAHA induce effetti antitumorali in questo stesso modello. La prima parte di questo progetto ha evidenziato quindi come sia indispensabile l'individuazione di un inibitore farmacologico di HuR per il trattamento di questo tipo di cancro così aggressivo. Ad oggi esistono soltanto due metodi di inibizione di questa RBP, tramite siRNA o trattamento

con MS-444. Il primo metodo presenta numerosi punti deboli prima tra tutti la sua difficile applicazione in vivo a causa delle limitazioni intrinseche alla metodica; le cellule tumorali acquisiscono i siRNA con una certa difficoltà, ed essi sono poco stabili nel siero e difficilmente indirizzabili all'interno della massa tumorale. L'utilizzo di MS-444 invece, pur presentando alcuni vantaggi, non è in grado di inibire direttamente l'interazione tra HuR e i suoi mRNA target, ma si limita ad alterare la localizzazione sub-cellulare della proteina bloccandone la dimerizzazione¹⁹⁶, inoltre la sua somministrazione in vivo non ha dato i risultati attesi; il trattamento con MS-444 di topi in grado di sviluppare cancro del colon-retto ha infatti comportato un aumento del numero e delle dimensioni dei tumori rispetto ai controlli¹⁹⁷.

Per questi motivi abbiamo voluto testare gli effetti di CMLD-2, una nuova piccola molecola sintetizzata da Wu e colleghi, in grado di legare HuR in modo competitive bloccandone così l'interazione con i siti ARE dei suoi mRNA bersaglio¹⁴³.

Abbiamo per prima cosa dimostrato che il trattamento con CMLD-2 effettuato su linee cellulari di tumore tiroideo (papillifero o anaplastico) induce una forte e significativa diminuzione della vitalità cellulare a dosi e tempi diversi, con un IC50 media tra tutte le linee posta pari 35 μ M. Gran parte degli effetti osservabili sulla vitalità cellulare sono dovuti a morte cellulare per apoptosi.

La somministrazione di CMLD-2 35 μ M per 72 ore ha effetti anche sulla capacità migratoria e sull'aggressività tumorale. Per quanto riguarda la prima essa è stata testata mediante un esperimento di scratch-assay, per mezzo del quale è stato possibile dimostrare come le cellule tumorali trattate impiegavano più tempo per chiudere la "ferita" prodotta. Per quanto riguarda l'aggressività tumorale, questa molecola si è dimostrata in grado di inibire la crescita cellulare ancoraggio-indipendente, determinando una netta riduzione del numero di colonie in soft-agar. Con questo primo setting sperimentale abbiamo così dimostrato come l'inibizione di HuR mediante CMLD-2 determinasse effetti simili su vitalità sopravvivenza e

aggressività tumorale, rispetto a quelli ottenuti con il silenziamento mediante siRNA, senza però presentarne i possibili punti deboli precedentemente descritti.

Al fine di entrare più nel dettaglio dei meccanismi molecolari alla base degli effetti osservati, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su un accurato studio di Lebedeva e colleghi, riguardante l'individuazione dei target di HuR la cui espressione viene modificata dal knock-down⁹⁰ di questa RBP.

Lo studio successivo ha quindi avuto come oggetto MAD2, in quanto target di HuR la quale ne regola l'espressione. MAD2 (mitotic arrest deficient 2) è un componente chiave del complesso MAD2/Bub il quale a sua volta riveste un ruolo fondamentale tra le proteine del SAC (spindle assembly checkpoint), il checkpoint che monitora la separazione dei cromatidi fratelli determinando o meno la progressione da metafase ad anafase¹⁹⁸. La correlazione tra la sua espressione e la sopravvivenza è stata dimostrata in numerosi tipi di cancro, risultando a volte positiva, altre volte negativa, dipendentemente dai tipi di tumore oggetto di studio¹⁹⁹. Wada et al hanno dimostrato come MAD2 sia maggiormente espresso nei tumori anaplastici tiroidei rispetto a quelli differenziati, suggerendo un suo diretto coinvolgimento nella tumorigenesi e nell'induzione di un fenotipo maggiormente aggressive in questo tipo di cancro¹⁸⁴.

Come prima cosa abbiamo confermato come MAD2 sia un mRNA target di HuR anche nel nostro modello mediante immunoprecipitazione seguita da analisi tramite qPCR. Coerentemente con la nostra ipotesi, l'inibizione di HuR mediante CMLD-2 determina una forte e significativa riduzione dei livelli proteici di MAD2.

Data l'assenza, fin qui, di dati circa gli effetti del silenziamento di MAD2 in linee cellulari di tumore tiroideo, abbiamo dimostrato per la prima volta come la sua down-regolazione mediante siRNA determini effetti rilevanti sulla vitalità cellulare in questo modello di tumore.

Con i risultati ottenuti fin qui abbiamo potuto chiarire come l'inibizione di HuR mediante CMLD-2 determini una riduzione dei livelli di espressione di MAD2, la quale induce una riduzione della vitalità cellulare in linee cellulari di tumore papillifero e anaplastico tiroideo.

A questo punto abbiamo voluto dimostrare come una parte degli effetti riscontrati dopo somministrazione di CMLD-2 fossero direttamente legati alla down-regolazione di MAD2. Come da ipotesi, infatti, il trattamento con CMLD-2 in cellule over-esprimenti MAD2 ha determinato un parziale recupero dell'espressione della sua proteina e un'attenuazione di circa il 30% degli effetti di tale molecola sulla vitalità cellulare, confermando come la nostra speculazione fosse corretta.

Complessivamente in questo studio svolto nel corso del mio dottorato, ho potuto contribuire a dimostrare per la prima volta gli effetti del silenziamento mediante siRNA o trattamento farmacologico con CMLD-2 di HuR nel tumore tiroideo. Abbiamo fornito inoltre una spiegazione molecolare al meccanismo d'azione con cui questa nuova molecola è capace di indurre effetti antitumorali, il quale comprende l'espressione e l'attività di MAD2.

Qualora confermati anche in vivo, questi dati suggeriscono come CMLD-2 possa trovare un'applicazione nello sviluppo di terapie innovative riguardanti il trattamento del tumore tiroideo, ed in particolare de tumore anaplastico tiroideo, per il quale ad oggi si è ancora molto lontani dall'aver trovato un trattamento efficace nell'incrementare la sopravvivenza dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Coppin, L., Leclerc, J., Vincent, A., Porchet, N. & Pigny, P. Messenger RNA Life-Cycle in Cancer Cells: Emerging Role of Conventional and Non-Conventional RNA-Binding Proteins? *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
2. Singh, G., Pratt, G., Yeo, G. W. & Moore, M. J. The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. *Annu Rev Biochem* **84**, 325–354 (2015).
3. Calabretta, S. & Richard, S. Emerging Roles of Disordered Sequences in RNA-Binding Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **40**, 662–672 (2015).
4. Gerstberger, S., Hafner, M. & Tuschl, T. A census of human RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics* **15**, 829–845 (2014).
5. Gerstberger, S., Hafner, M., Ascano, M. & Tuschl, T. Evolutionary Conservation and Expression of Human RNA-Binding Proteins and Their Role in Human Genetic Disease. *Adv Exp Med Biol* **825**, 1–55 (2014).
6. Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. & Dreyfuss, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* **582**, 1977–1986 (2008).
7. Stefl, R., Skrisovska, L. & Allain, F. H.-T. RNA sequence- and shape-dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep* **6**, 33–38 (2005).
8. Adeli, K. Translational control mechanisms in metabolic regulation: critical role of RNA binding proteins, microRNAs, and cytoplasmic RNA granules. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **301**, E1051-1064 (2011).
9. Dahan, N. & Choder, M. The eukaryotic transcriptional machinery regulates mRNA translation and decay in the cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 169–173 (2013).

10. Pérez-Ortín, J. E., Alepuz, P., Chávez, S. & Choder, M. Eukaryotic mRNA decay: methodologies, pathways, and links to other stages of gene expression. *J. Mol. Biol.* **425**, 3750–3775 (2013).
11. Han, J., Xiong, J., Wang, D. & Fu, X.-D. Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends Cell Biol.* **21**, 336–343 (2011).
12. Le Hir, H., Saulière, J. & Wang, Z. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 41–54 (2016).
13. Sibley, C. R. Regulation of gene expression through production of unstable mRNA isoforms. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1196–1205 (2014).
14. Matera, A. G. & Wang, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 108–121 (2014).
15. Shi, Y. Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 655–670 (2017).
16. Kornblihtt, A. R. *et al.* Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 153–165 (2013).
17. Fu, X.-D. & Ares, M. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 689–701 (2014).
18. Moehle, E. A., Braberg, H., Krogan, N. J. & Guthrie, C. Adventures in time and space: splicing efficiency and RNA polymerase II elongation rate. *RNA Biol* **11**, 313–319 (2014).
19. Parent, A. & Bisailon, M. [Synergy between transcription and mRNA processing events]. *Med Sci (Paris)* **22**, 626–632 (2006).
20. Eckmann, C. R., Rammelt, C. & Wahle, E. Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 348–361 (2011).

21. Jalkanen, A. L., Coleman, S. J. & Wilusz, J. Determinants and implications of mRNA poly(A) tail size--does this protein make my tail look big? *Semin. Cell Dev. Biol.* **34**, 24–32 (2014).
22. Weill, L., Belloc, E., Bava, F.-A. & Méndez, R. Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 577–585 (2012).
23. Curinha, A., Oliveira Braz, S., Pereira-Castro, I., Cruz, A. & Moreira, A. Implications of polyadenylation in health and disease. *Nucleus* **5**, 508–519 (2014).
24. Brook, M. & Gray, N. K. The role of mammalian poly(A)-binding proteins in co-ordinating mRNA turnover. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 856–864 (2012).
25. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. & Izaurralde, E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 9–22 (2007).
26. Garneau, N. L., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 113–126 (2007).
27. Brennan, C. M. & Steitz, J. A. HuR and mRNA stability. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 266–277 (2001).
28. Wilusz, C. J. & Wilusz, J. Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet.* **20**, 491–497 (2004).
29. Srikantan, S., Tominaga, K. & Gorospe, M. Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 372–379 (2012).
30. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1325018/>. (Accessed: 2nd August 2018)
31. Brennan, S. E. *et al.* The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer Res.* **69**, 5168–5176 (2009).

32. Srikantan, S. & Gorospe, M. HuR function in disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 189–205 (2012).
33. Abdelmohsen, K. & Gorospe, M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**, 214–229 (2010).
34. Abdelmohsen, K. *et al.* Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs. *Nucleic Acids Res* **39**, 8513–8530 (2011).
35. Kim, D.-Y. *et al.* hnRNP Q mediates a phase-dependent translation-coupled mRNA decay of mouse Period3. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8901–8914 (2011).
36. Hitti, E. *et al.* Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2399–2407 (2006).
37. Aroca, A., Díaz-Quintana, A. & Díaz-Moreno, I. A structural insight into the C-terminal RNA recognition motifs of T-cell intracellular antigen-1 protein. *FEBS Lett.* **585**, 2958–2964 (2011).
38. Cuadrado, A., Navarro-Yubero, C., Furneaux, H. & Muñoz, A. Neuronal HuD gene encoding a mRNA stability regulator is transcriptionally repressed by thyroid hormone. *J. Neurochem.* **86**, 763–773 (2003).
39. de Silanes, I. L., Zhan, M., Lal, A., Yang, X. & Gorospe, M. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2987–2992 (2004).
40. Hinman, M. N. & Lou, H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3168–3181 (2008).
41. Kuwano, Y. & Gorospe, M. Protecting the stress response, guarding the MKP-1 mRNA. *Cell Cycle* **7**, 2640–2642 (2008).

42. Yi, J. *et al.* Reduced nuclear export of HuR mRNA by HuR is linked to the loss of HuR in replicative senescence. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1547–1558 (2010).
43. Abdelmohsen, K., Lal, A., Kim, H. H. & Gorospe, M. Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle* **6**, 1288–1292 (2007).
44. López de Silanes, I., Lal, A. & Gorospe, M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol* **2**, 11–13 (2005).
45. Liao, B., Hu, Y. & Brewer, G. Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 511–518 (2007).
46. Raineri, I., Wegmueller, D., Gross, B., Certa, U. & Moroni, C. Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1279–1288 (2004).
47. Zucconi, B. E. & Wilson, G. M. Modulation of neoplastic gene regulatory pathways by the RNA-binding factor AUF1. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**, 2307–2325 (2011).
48. Gratacós, F. M. & Brewer, G. The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**, 457–473 (2010).
49. Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G. & Schneider, R. J. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **284**, 499–502 (1999).
50. Chen, C. Y. *et al.* AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**, 451–464 (2001).
51. Kim, H. S. *et al.* Different modes of interaction by TIAR and HuR with target RNA and DNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1117–1130 (2011).
52. Damgaard, C. K. & Lykke-Andersen, J. Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev.* **25**, 2057–2068 (2011).
53. Kuwano, Y. *et al.* NF90 selectively represses the translation of target mRNAs bearing an AU-rich signature motif. *Nucleic Acids Res* **38**, 225–238 (2010).

54. Bassell, G. J. & Warren, S. T. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* **60**, 201–214 (2008).
55. Sanduja, S., Blanco, F. F., Young, L. E., Kaza, V. & Dixon, D. A. The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 174–188 (2012).
56. Darnell, R. B. RNA regulation in neurologic disease and cancer. *Cancer Res Treat* **42**, 125–129 (2010).
57. Neelamraju, Y., Hashemikhabir, S. & Janga, S. C. The human RBPome: from genes and proteins to human disease. *J Proteomics* **127**, 61–70 (2015).
58. Hong, S. RNA Binding Protein as an Emerging Therapeutic Target for Cancer Prevention and Treatment. *J Cancer Prev* **22**, 203–210 (2017).
59. Busà, R. *et al.* The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene* **26**, 4372–4382 (2007).
60. Dang, H. *et al.* Oncogenic Activation of the RNA Binding Protein NELFE and MYC Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* **32**, 101-114.e8 (2017).
61. Degrauwe, N., Suvà, M.-L., Janiszewska, M., Riggi, N. & Stamenkovic, I. IMPs: an RNA-binding protein family that provides a link between stem cell maintenance in normal development and cancer. *Genes Dev.* **30**, 2459–2474 (2016).
62. Wurth, L. *et al.* UNR/CSDE1 Drives a Post-transcriptional Program to Promote Melanoma Invasion and Metastasis. *Cancer Cell* **30**, 694–707 (2016).
63. Wang, J., Liu, Q. & Shyr, Y. Dysregulated transcription across diverse cancer types reveals the importance of RNA-binding protein in carcinogenesis. *BMC Genomics* **16 Suppl 7**, S5 (2015).
64. Pereira, B., Billaud, M. & Almeida, R. RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends Cancer* **3**, 506–528 (2017).

65. Castello, A. *et al.* Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Mol. Cell* **63**, 696–710 (2016).
66. Papaemmanuil, E. *et al.* Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1384–1395 (2011).
67. Chabot, B. & Shkreta, L. Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J. Cell Biol.* **212**, 13–27 (2016).
68. Foulkes, W. D., Priest, J. R. & Duchaine, T. F. DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 662–672 (2014).
69. Hill, D. A. *et al.* DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science* **325**, 965 (2009).
70. Selvanathan, S. P. *et al.* Oncogenic fusion protein EWS-FLI1 is a network hub that regulates alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E1307-1316 (2015).
71. Eiring, A. M. *et al.* miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* **140**, 652–665 (2010).
72. Vo, D. T. *et al.* The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by tumor suppressor miRNAs. *RNA Biol* **8**, 817–828 (2011).
73. Vo, D. T. *et al.* The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by HuR via mRNA translation and stability in glioblastoma cells. *Mol. Cancer Res.* **10**, 143–155 (2012).
74. Ceresa, M., Mangado, N., Andrews, R. J. & Gonzalez Ballester, M. A. Computational Models for Predicting Outcomes of Neuroprosthesis Implantation: the Case of Cochlear Implants. *Mol. Neurobiol.* **52**, 934–941 (2015).
75. Chaudhury, A. *et al.* TGF-beta-mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI. *Nat. Cell Biol.* **12**, 286–293 (2010).

76. Richard, S. *et al.* Sam68 haploinsufficiency delays onset of mammary tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* **27**, 548–556 (2008).
77. Paronetto, M. P. *et al.* Alternative splicing of the cyclin D1 proto-oncogene is regulated by the RNA-binding protein Sam68. *Cancer Res.* **70**, 229–239 (2010).
78. Matter, N., Herrlich, P. & König, H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* **420**, 691–695 (2002).
79. Närvä, E. *et al.* RNA-binding protein L1TD1 interacts with LIN28 via RNA and is required for human embryonic stem cell self-renewal and cancer cell proliferation. *Stem Cells* **30**, 452–460 (2012).
80. Wendel, H.-G. *et al.* Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* **428**, 332–337 (2004).
81. Trotta, R. *et al.* BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer Cell* **3**, 145–160 (2003).
82. Koso, H. *et al.* Identification of RNA-Binding Protein LARP4B as a Tumor Suppressor in Glioma. *Cancer Res.* **76**, 2254–2264 (2016).
83. He, N. *et al.* A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Mol. Cell* **29**, 588–599 (2008).
84. Talwar, S. *et al.* Overexpression of RNA-binding protein CELF1 prevents apoptosis and destabilizes pro-apoptotic mRNAs in oral cancer cells. *RNA Biol* **10**, 277–286 (2013).
85. Li, L. *et al.* Critical role of histone demethylase RBP2 in human gastric cancer angiogenesis. *Mol. Cancer* **13**, 81 (2014).
86. Hwang, Y. S., Xianglan, Z., Park, K.-K. & Chung, W.-Y. Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis* **33**, 2135–2146 (2012).

87. Samanta, S., Sharma, V. M., Khan, A. & Mercurio, A. M. Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ER β : implications for triple-negative breast cancer. *Oncogene* **31**, 4689–4697 (2012).
88. Schmiedel, D. *et al.* The RNA binding protein IMP3 facilitates tumor immune escape by downregulating the stress-induced ligands ULPB2 and MICB. *Elife* **5**, (2016).
89. Govindaraju, S. & Lee, B. S. Adaptive and maladaptive expression of the mRNA regulatory protein HuR. *World J Biol Chem* **4**, 111–118 (2013).
90. Lebedeva, S. *et al.* Transcriptome-wide Analysis of Regulatory Interactions of the RNA-Binding Protein HuR. *Molecular Cell* **43**, 340–352 (2011).
91. Dassi, E. *et al.* Hyper conserved elements in vertebrate mRNA 3'-UTRs reveal a translational network of RNA-binding proteins controlled by HuR. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3201–3216 (2013).
92. Wang, W. *et al.* HuR Regulates p21 mRNA Stabilization by UV Light. *Mol Cell Biol* **20**, 760–769 (2000).
93. Jeyaraj, S., Dakhallah, D., Hill, S. R. & Lee, B. S. HuR stabilizes vacuolar H⁺-translocating ATPase mRNA during cellular energy depletion. *J. Biol. Chem.* **280**, 37957–37964 (2005).
94. von Roretz, C., Di Marco, S., Mazroui, R. & Gallouzi, I.-E. Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 336–347 (2011).
95. von Roretz, C. *et al.* Apoptotic-induced cleavage shifts HuR from being a promoter of survival to an activator of caspase-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* **20**, 154–168 (2013).
96. Kang, M.-J. *et al.* NF-kappaB activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3K-AKT signaling, to promote gastric tumorigenesis. *Gastroenterology* **135**, 2030–2042, 2042.e1–3 (2008).

97. Ayupova, D. A., Singh, M., Leonard, E. C., Basile, D. P. & Lee, B. S. Expression of the RNA-stabilizing protein HuR in ischemia-reperfusion injury of rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **297**, F95–F105 (2009).
98. Jeyaraj, S. C., Singh, M., Ayupova, D. A., Govindaraju, S. & Lee, B. S. Transcriptional control of human antigen R by bone morphogenetic protein. *J. Biol. Chem.* **285**, 4432–4440 (2010).
99. Hruska, K. A. *et al.* Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F130–143 (2000).
100. Zeisberg, M. *et al.* BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat. Med.* **9**, 964–968 (2003).
101. Al-Ahmadi, W., Al-Ghamdi, M., Al-Haj, L., Al-Saif, M. & Khabar, K. S. A. Alternative polyadenylation variants of the RNA binding protein, HuR: abundance, role of AU-rich elements and auto-Regulation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 3612–3624 (2009).
102. Dai, W., Zhang, G. & Makeyev, E. V. RNA-binding protein HuR autoregulates its expression by promoting alternative polyadenylation site usage. *Nucleic Acids Res.* **40**, 787–800 (2012).
103. Yi, J. *et al.* Reduced nuclear export of HuR mRNA by HuR is linked to the loss of HuR in replicative senescence. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1547–1558 (2010).
104. Cho, S.-J., Jung, Y.-S., Zhang, J. & Chen, X. The RNA-binding protein RNPC1 stabilizes the mRNA encoding the RNA-binding protein HuR and cooperates with HuR to suppress cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **287**, 14535–14544 (2012).
105. Al-Ahmadi, W., Al-Ghamdi, M., Al-Souhibani, N. & Khabar, K. S. A. miR-29a inhibition normalizes HuR over-expression and aberrant AU-rich mRNA stability in invasive cancer. *J. Pathol.* **230**, 28–38 (2013).

106. Wang, J. *et al.* Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis. *Int J Mol Sci* **14**, 10015–10041 (2013).
107. Li, H. *et al.* Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 44623–44630 (2002).
108. Fan, X. C. & Steitz, J. A. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *PNAS* **95**, 15293–15298 (1998).
109. Abdelmohsen, K. *et al.* Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *EMBO J.* **28**, 1271–1282 (2009).
110. Chu, P.-C., Chuang, H.-C., Kulp, S. K. & Chen, C.-S. The mRNA-stabilizing factor HuR protein is targeted by β -TrCP protein for degradation in response to glycolysis inhibition. *J. Biol. Chem.* **287**, 43639–43650 (2012).
111. Mazroui, R. *et al.* Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J. Cell Biol.* **180**, 113–127 (2008).
112. Cleary, M. L., Mellentin, J. D., Spies, J. & Smith, S. D. Chromosomal translocation involving the beta T cell receptor gene in acute leukemia. *J. Exp. Med.* **167**, 682–687 (1988).
113. Bitoun, M. *et al.* Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* **37**, 1207–1209 (2005).
114. Rosette, C. *et al.* Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **26**, 943–950 (2005).
115. Heinonen, M. *et al.* Prognostic role of HuR in hereditary breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6959–6963 (2007).
116. Heinonen, M. *et al.* Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Res.* **65**, 2157–2161 (2005).

117. Lim, S.-J., Kim, H. J., Kim, J. Y., Park, K. & Lee, C.-M. Expression of HuR is associated with increased cyclooxygenase-2 expression in uterine cervical carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **26**, 229–234 (2007).
118. Wang, J., Wang, B., Bi, J. & Zhang, C. Cytoplasmic HuR expression correlates with angiogenesis, lymphangiogenesis, and poor outcome in lung cancer. *Med. Oncol.* **28 Suppl 1**, S577-585 (2011).
119. Barbisan, F. *et al.* Overexpression of ELAV-like protein HuR is associated with increased COX-2 expression in atrophy, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, and incidental prostate cancer in cystoprostatectomies. *Eur. Urol.* **56**, 105–112 (2009).
120. Brosens, L. A. A. *et al.* Increased expression of cytoplasmic HuR in familial adenomatous polyposis. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 424–427 (2008).
121. Fay, J., Kelehan, P., Lambkin, H. & Schwartz, S. Increased expression of cellular RNA-binding proteins in HPV-induced neoplasia and cervical cancer. *J. Med. Virol.* **81**, 897–907 (2009).
122. Milne, A. N. A. *et al.* Early-onset gastric cancers have a different molecular expression profile than conventional gastric cancers. *Mod. Pathol.* **19**, 564–572 (2006).
123. Young, L. E. *et al.* The mRNA binding proteins HuR and tristetraprolin regulate cyclooxygenase 2 expression during colon carcinogenesis. *Gastroenterology* **136**, 1669–1679 (2009).
124. Giles, K. M. *et al.* The 3'-untranslated region of p21WAF1 mRNA is a composite cis-acting sequence bound by RNA-binding proteins from breast cancer cells, including HuR and poly(C)-binding protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 2937–2946 (2003).
125. Leandersson, K., Riesbeck, K. & Andersson, T. Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells. *Nucleic Acids Res* **34**, 3988–3999 (2006).

126. Yoo, P. S., Mulkeen, A. L. & Cha, C. H. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor: implications for tumor angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* **12**, 4937–4942 (2006).
127. Ido, K. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human astrocytic tumors. *Neuropathology* **28**, 604–611 (2008).
128. Wang, J. *et al.* The expression of RNA-binding protein HuR in non-small cell lung cancer correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymph node metastasis. *Oncology* **76**, 420–429 (2009).
129. Denkert, C. *et al.* Expression of the ELAV-like protein HuR in human colon cancer: association with tumor stage and cyclooxygenase-2. *Mod. Pathol.* **19**, 1261–1269 (2006).
130. Nabors, L. B., Gillespie, G. Y., Harkins, L. & King, P. H. HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res.* **61**, 2154–2161 (2001).
131. Lim, S.-J., Lee, S.-H., Joo, S. H., Song, J. Y. & Choi, S. I. Cytoplasmic expression of HuR is related to cyclooxygenase-2 expression in colon cancer. *Cancer Res Treat* **41**, 87–92 (2009).
132. Tran, H., Maurer, F. & Nagamine, Y. Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7177–7188 (2003).
133. Dong, R. *et al.* Stabilization of Snail by HuR in the process of hydrogen peroxide induced cell migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 318–321 (2007).

134. Yuan, Z., Sanders, A. J., Ye, L., Wang, Y. & Jiang, W. G. Knockdown of human antigen R reduces the growth and invasion of breast cancer cells in vitro and affects expression of cyclin D1 and MMP-9. *Oncol. Rep.* **26**, 237–245 (2011).
135. Hostetter, C. *et al.* Cytoplasmic accumulation of the RNA binding protein HuR is central to tamoxifen resistance in estrogen receptor positive breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1496–1506 (2008).
136. Filippova, N. *et al.* The RNA-binding protein HuR promotes glioma growth and treatment resistance. *Mol. Cancer Res.* **9**, 648–659 (2011).
137. Urano, N. *et al.* Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **28**, 375–381 (2006).
138. Sève, P. *et al.* Expression of class III {beta}-tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5481–5486 (2005).
139. Chen, L. *et al.* HIV protease inhibitor lopinavir-induced TNF-alpha and IL-6 expression is coupled to the unfolded protein response and ERK signaling pathways in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 70–77 (2009).
140. Latorre, E. *et al.* Downregulation of HuR as a new mechanism of doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Mol. Cancer* **11**, 13 (2012).
141. Muralidharan, R. *et al.* Tumor-targeted nanoparticle delivery of HuR siRNA inhibits lung tumor growth in vitro and in vivo by disrupting the oncogenic activity of the RNA-binding protein HuR. *Mol Cancer Ther* molcanther.0134.2017 (2017). doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0134

142. Muralidharan, R. *et al.* Folate receptor-targeted nanoparticle delivery of HuR-RNAi suppresses lung cancer cell proliferation and migration. *J Nanobiotechnology* **14**, 47 (2016).
143. Wu, X. *et al.* Identification and Validation of Novel Small Molecule Disruptors of HuR-mRNA Interaction. *ACS Chem Biol* **10**, 1476–1484 (2015).
144. David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. & Manley, J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* **463**, 364–368 (2010).
145. Rounbehler, R. J. *et al.* Tristetraprolin impairs myc-induced lymphoma and abolishes the malignant state. *Cell* **150**, 563–574 (2012).
146. Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* **146**, 904–917 (2011).
147. Zuber, J. *et al.* RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* **478**, 524–528 (2011).
148. Carlomagno, F. & Santoro, M. Thyroid cancer in 2010: A roadmap for targeted therapies. *Nature Reviews Endocrinology* (2011). doi:10.1038/nrendo.2010.232
149. Eszlinger, M. & Paschke, R. Molecular fine-needle aspiration biopsy diagnosis of thyroid nodules by tumor specific mutations and gene expression patterns. *Mol. Cell. Endocrinol.* **322**, 29–37 (2010).
150. Ciavardelli, D., Bellomo, M., Consalvo, A., Crescimanno, C. & Vella, V. Metabolic Alterations of Thyroid Cancer as Potential Therapeutic Targets. *Biomed Res Int* **2017**, (2017).
151. Furukawa, K. *et al.* Long-term trend of thyroid cancer risk among Japanese atomic-bomb survivors: 60 years after exposure. *Int. J. Cancer* **132**, 1222–1226 (2013).

152. Bacher-Stier, C. *et al.* Incidence and clinical characteristics of thyroid carcinoma after iodine prophylaxis in an endemic goiter country. *Thyroid* **7**, 733–741 (1997).
153. Leenhardt, L. & Grosclaude, P. [Epidemiology of thyroid carcinoma over the world]. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **72**, 136–148 (2011).
154. Brown, R. L., de Souza, J. A. & Cohen, E. E. Thyroid Cancer: Burden of Illness and Management of Disease. *J Cancer* **2**, 193–199 (2011).
155. Noguchi, S., Noguchi, A. & Murakami, N. Papillary carcinoma of the thyroid. I. Developing pattern of metastasis. *Cancer* **26**, 1053–1060 (1970).
156. Oertel, Y. C. Some thoughts about fine needle aspirations of thyroid nodules. *Thyroid* **14**, 86–87 (2004).
157. Kebebew, E. & Clark, O. H. Medullary thyroid cancer. *Curr Treat Options Oncol* **1**, 359–367 (2000).
158. Gilliland, F. D., Hunt, W. C., Morris, D. M. & Key, C. R. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer* **79**, 564–573 (1997).
159. Kebebew, E., Greenspan, F. S., Clark, O. H., Woeber, K. A. & McMillan, A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer* **103**, 1330–1335 (2005).
160. Besic, N. *et al.* Effect of primary treatment on survival in anaplastic thyroid carcinoma. *Eur J Surg Oncol* **27**, 260–264 (2001).
161. Smallridge, R. C. & Copland, J. A. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **22**, 486–497 (2010).
162. Demeter, J. G., De Jong, S. A., Lawrence, A. M. & Paloyan, E. Anaplastic thyroid carcinoma: risk factors and outcome. *Surgery* **110**, 956–961; discussion 961-963 (1991).

163. Myskow, M. W. *et al.* The role of immunoperoxidase techniques on paraffin embedded tissue in determining the histogenesis of undifferentiated thyroid neoplasms. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **24**, 335–341 (1986).
164. Molinaro, E. *et al.* Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies. *Nature Reviews Endocrinology* **13**, 644–660 (2017).
165. Glaser, S. M. *et al.* Anaplastic thyroid cancer: Prognostic factors, patterns of care, and overall survival. *Head Neck* **38 Suppl 1**, E2083-2090 (2016).
166. Rossi, R., Cady, B., Meissner, W. A., Sedgwick, C. E. & Werber, J. Prognosis of undifferentiated carcinoma and lymphoma of the thyroid. *The American Journal of Surgery* **135**, 589–596 (1978).
167. Ordóñez, N. G., El-Naggar, A. K., Hickey, R. C. & Samaan, N. A. Anaplastic thyroid carcinoma. Immunocytochemical study of 32 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **96**, 15–24 (1991).
168. Ryff-de Lèche, A., Staub, J. J., Kohler-Faden, R., Müller-Brand, J. & Heitz, P. U. Thyroglobulin production by malignant thyroid tumors. An immunocytochemical and radioimmunoassay study. *Cancer* **57**, 1145–1153 (1986).
169. Wreesmann, V. B. *et al.* Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. *Am. J. Pathol.* **161**, 1549–1556 (2002).
170. Charles, R.-P., Silva, J., Iezza, G., Phillips, W. A. & McMahon, M. Activating BRAF and PIK3CA mutations cooperate to promote anaplastic thyroid carcinogenesis. *Mol. Cancer Res.* **12**, 979–986 (2014).
171. Landa, I. *et al.* Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J. Clin. Invest.* **126**, 1052–1066 (2016).
172. Kunstman, J. W. *et al.* Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via whole-exome sequencing. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2318–2329 (2015).

173. Jeon, M. J. *et al.* Genomic Alterations of Anaplastic Thyroid Carcinoma Detected by Targeted Massive Parallel Sequencing in a BRAF(V600E) Mutation-Prevalent Area. *Thyroid* **26**, 683–690 (2016).
174. Donghi, R. *et al.* Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* **91**, 1753–1760 (1993).
175. Haigh, P. I. *et al.* Completely resected anaplastic thyroid carcinoma combined with adjuvant chemotherapy and irradiation is associated with prolonged survival. *Cancer* **91**, 2335–2342 (2001).
176. Pierie, J.-P. E. N., Muzikansky, A., Gaz, R. D., Faquin, W. C. & Ott, M. J. The effect of surgery and radiotherapy on outcome of anaplastic thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol* **9**, 57–64 (2002).
177. Shimaoka, K., Schoenfeld, D. A., DeWys, W. D., Creech, R. H. & DeConti, R. A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin plus cisplatin in patients with advanced thyroid carcinoma. *Cancer* **56**, 2155–2160 (1985).
178. Ain, K. B., Egorin, M. J. & DeSimone, P. A. Treatment of anaplastic thyroid carcinoma with Paclitaxel : phase 2 trial using ninety-six-hour infusion. Collaborative Anaplastic Thyroid Cancer Health Intervention Trials (CATCHIT) Group. *Thyroid* **10**, 587–594 (2000).
179. Baldan, F. *et al.* Identification of tumorigenesis-related mRNAs associated with RNA-binding protein HuR in thyroid cancer cells. *Oncotarget* **7**, 63388–63407 (2016).
180. Ungerstedt, J. S. *et al.* Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 673–678 (2005).
181. Baldan, F. *et al.* Synergy between HDAC and PARP Inhibitors on Proliferation of a Human Anaplastic Thyroid Cancer-Derived Cell Line. *Int J Endocrinol* **2015**, 978371 (2015).

182. Zhang, J. *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibits EGF-induced cell transformation via reduction of cyclin D1 mRNA stability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **263**, 218–224 (2012).
183. Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 49–62 (2007).
184. Wada, N. *et al.* Overexpression of the Mitotic Spindle Assembly Checkpoint Genes hBUB1, hBUBR1 and hMAD2 in Thyroid Carcinomas with Aggressive Nature. *Anticancer Res* **28**, 139–144 (2008).
185. Siomi, H. & Dreyfuss, G. RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**, 345–353 (1997).
186. Trojanowicz, B., Dralle, H. & Hoang-Vu, C. AUF1 and HuR: possible implications of mRNA stability in thyroid function and disorders. *Thyroid Res* **4**, S5 (2011).
187. Schwanhäusser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).
188. Rissland, O. S. The organization and regulation of mRNA-protein complexes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **8**, (2017).
189. Ravanidis, S., Kattan, F.-G. & Doxakis, E. Unraveling the Pathways to Neuronal Homeostasis and Disease: Mechanistic Insights into the Role of RNA-Binding Proteins and Associated Factors. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
190. Wurth, L. & Gebauer, F. RNA-binding proteins, multifaceted translational regulators in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1849**, 881–886 (2015).
191. Wurth, L. Versatility of RNA-Binding Proteins in Cancer. *Comp. Funct. Genomics* **2012**, 178525 (2012).

192. Brauner, E. *et al.* Combining BRAF inhibitor and anti PD-L1 antibody dramatically improves tumor regression and anti tumor immunity in an immunocompetent murine model of anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget* **7**, 17194–17211 (2016).
193. Sugitani, I., Onoda, N., Ito, K.-I. & Suzuki, S. Management of Anaplastic Thyroid Carcinoma: the Fruits from the ATC Research Consortium of Japan. *J Nippon Med Sch* **85**, 18–27 (2018).
194. Tiedje, V. *et al.* Anaplastic thyroid carcinoma: review of treatment protocols. *Endocrine-Related Cancer* **25**, R153–R161 (2018).
195. Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R. & Pazdur, R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* **12**, 1247–1252 (2007).
196. Meisner, N.-C. *et al.* Identification and mechanistic characterization of low-molecular-weight inhibitors for HuR. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 508–515 (2007).
197. Lang, M. *et al.* HuR Small-Molecule Inhibitor Elicits Differential Effects in Adenomatosis Polyposis and Colorectal Carcinogenesis. *Cancer Res* **77**, 2424–2438 (2017).
198. Li, Y. & Benezra, R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* **274**, 246–248 (1996).
199. Furlong, F. *et al.* Low MAD2 expression levels associate with reduced progression-free survival in patients with high-grade serous epithelial ovarian cancer. *J Pathol* **226**, 746–755 (2012).